

Oxidative Regulation des humanen ERG-Kaliumkanals

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Katrin Kolbe
geboren am 28. April 1977 in Gera

Dissertation eingereicht am 05.12.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, Universität Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Terlau, Universität Lübeck
3. Gutachter: PD Dr. Nils Decher, Universität Marburg

Tag der Verteidigung: 27.04.2009

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

iv

Bilder- und Tabellenverzeichnis

vi

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Oxidative Prozesse und Reparatursysteme in der Zelle	1
1.1.1 Entstehung oxidierender Substanzen	1
1.1.2 ROS und Schutzmechanismen	1
1.1.3 Redoxstatus, oxidativer Stress und Krankheiten	3
1.1.4 Oxidativer Stress im Herzen	4
1.1.5 Oxidative Modifikation von Kaliumkanälen	5
1.2 Kaliumkanäle in der tierischen Zelle	6
1.2.1 Nomenklatur der Kaliumkanäle	6
1.2.2 Allgemeine Struktur	7
1.3 Der hERG-Kanal	7
1.3.1 Aufbau und molekulare Funktionsprinzipien	8
1.3.1.1 Aktivierung und Deaktivierung	9
1.3.1.2 Inaktivierung und Rückkehr von der Inaktivierung	10
1.3.2 Pharmakologische Eigenschaften des Kanals	10
1.3.3 Regulationsmechanismen	11
1.3.4 Physiologische Bedeutung	13
1.3.5 Oxidative Modifikation von hERG	14
1.4 Zielstellung dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Molekularbiologie und Zellkultur	17
2.1.1 Ausgangsplasmide	17
2.1.2 Generierung der hERG-Kanalmutanten	17
2.1.3 Zellkultur	18
2.1.4 Transfektion	18
2.2 Elektrophysiologische Methoden	19
2.2.1 <i>Patch-clamp</i> -Messungen: <i>whole-cell</i> -Konfiguration	19
2.2.1.1 <i>Patch</i> -Pipetten, Lösungen und Chemikalien	20
2.2.2 Messprotokolle und Datenanalyse	21
2.2.2.1 Aktivierungsparameter von hERG	21

2.2.2.2	Deaktivierungs- und Inaktivierungsparameter von hERG	23
2.2.2.3	Effekt verschiedener Substanzen auf hERG	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Modifikation von Kaliumkanälen durch ChT	27
3.2	Charakterisierung des ChT-Effektes an hERG	29
3.2.1	Variabilität des ChT-Effektes	29
3.2.2	Stromreduktion in Abhängigkeit von der ChT-Konzentration	30
3.2.3	Stromreduktion in Abhängigkeit von der Kanalkonformation	30
3.2.4	Reversibilität der ChT-induzierten Stromreduktion	31
3.2.5	Modifikation der Schalteigenschaften durch ChT	32
3.2.6	ChT als möglicher Porenblocker	33
3.2.7	Rolle der Histidine 578 und 587	34
3.3	Rolle der Methionine bei der Stromreduktion durch ChT	35
3.4	Zusammenhang ChT-Sensitivität und Schaltverhalten	40
3.4.1	Deaktivierung	40
3.4.2	Inaktivierung	40
3.5	Effekt von Cystein-modifizierenden Substanzen auf hERG	42
3.5.1	Charakterisierung des MTSES-Effektes an hERG	43
3.5.2	MTSES an den Kaliumkanälen Kv1.5 und hEAG1	44
3.5.3	Modifikation MTSES-behandelter Zellen mit ChT	44
3.5.4	Modifikationen der Schalteigenschaften durch MTSES	45
3.6	Molekulare Grundlagen der MTSES-induzierten Stromreduktion	46
3.7	Zusammenhang MTSES-Reaktivität und Schaltverhalten	51
3.7.1	Deaktivierung	51
3.7.2	Inaktivierung	54
3.8	Rolle der Methionine bei der Modifikation von hERG durch ChT im partiell oder vollständig MTSES-unsensitiven Kanal	55
4	Diskussion	57
4.1	ROS und ROS-induzierende Substanzen modifizieren hERG	57
4.2	ChT als modifizierende Substanz	59
4.2.1	Effekte von ChT am hERG-Kanal	59
4.2.2	Wirkungsmechanismus von ChT in der Zelle	60
4.4.3	ChT als Met-oxidierende Substanz	60

4.3	Met-Oxidation an hERG	61
4.4	Cys-Modifikationen an hERG	63
4.4.1	Effekte von MTSES an hERG	63
4.4.2	Mechanismus der MTSES-induzierten Stromreduktion	65
4.4.2.1	N-Terminus	65
4.4.2.2	Cys 723	65
4.5	Korrelation der Schalteigenschaften und oxidativen Sensitivität	68
4.5.1	Deaktivierung	68
4.5.2	Inaktivierung	69
4.6	ROS-induzierte Stromreduktion an hERG	69
5	Zusammenfassung	73
	deutsch	73
	englisch	75
6	Literaturverzeichnis	77-89
	Anhang	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>arachidonic acid</i>
A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
AS	Aminosäuren
Asc	<i>ascorbic acid</i>
BK-Kanal	<i>big conductance</i> -Kanal
ChT	Chloramin T
cNBD	<i>cyclic nukleotide-binding domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DTT	Dithiotreitol
GIRK-Kanal	<i>G protein-regulated inwardly rectifying K⁺</i> -Kanal
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/ Glutathion oxidiert
hEAG	humaner EAG-Kanal (<i>ether-a-gogo gene</i>)
HEK293	<i>human embryonal kidney cell line 293</i>
HEPES	N-(2-Hydroethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hERG	humaner ERG-Kanal (<i>ether-a-gogo related gene</i>)
HP	Haltepotential
I/R	Ischämie/Reperfusion
I _{Kr}	Strom (I) Kalium <i>rapid</i>
IUPHAR	<i>International union of pharmacology</i>
KAT	Katalase
K _{Ca2+}	calciumabhängige Kaliumkanäle
Kv-Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle
LCAC	<i>long chain acyl-carnitine</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPG	Lysophosphoglycerid
IP3	Inositoltriphosphat
PBS	<i>phosphat buffer salt solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
MnTBAP	Mangan(III)tetrakis(4-Benzoesäure) porphyrin-Chlorid
MP	Membranpotential
MPO	Myeloperoxidase

MSRA/B	Methionine-Sulfoxid Reduktase Typ A/B
MTSEA	Methanthiosulfonsäure-5-2-aminoethylester Hydrobromid
MTSES	Methanthiosulfonsäure-5-(2-sulfo)ethylester Natrium-Salz
MTSET	Methanthiosulfonsäure-5-(2-trimethylammonium)ethylester Bromid
NEM	N-ethylmaleimid
NO	<i>nitric oxide</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
PAS	Akronym der Genprodukte von Per, Arnt und Sim
p-Tsa	p-Toluensulfonamid
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
S	Segment
SOD	Superoxid Dismutase
SR	sakroplasmatisches Retikulum
TM	transmembran
TR/TRR	Thioredoxin/ Thioredoxin Reduktase
WT	Wildtyp
X/XO	Xanthin/Xanthin Oxidase-System

Bilder-und Tabellenverzeichnis

Bild	Titel	Seite
1.1	Übersicht einiger ROS-produzierender und ROS-neutralisierender Prozesse und Substanzen	2
1.2	Schematische Darstellung der hERG α -UE (angelehnt an Jiang <i>et al.</i> , 2005)	9
1.3	Regulationsmechanismen an hERG	12
1.4	Schematische Darstellung der vier Phasen eines AP in den Purkinje Fasern des Herzens	13
1.5	Signale eines Oberflächen-EKG im gesunden Herzen und während einer Tachykardie	14
2.1	Vereinfachtes Schaltbild eines <i>patch-clamp</i> -Verstärkers	19
2.2	Ermittlung der Aktivierungsparameter von hERG	22
2.3	Pulsprotokoll für die Ermittlung der spannungsabhängigen Rückkehr aus der Inaktivierung	23
2.4	Pulsprotokolle mit Beispielen für den Verlauf der Stromspuren bei -145 mV und 55 mV	24
2.5	Ermittlung, graphische Darstellung und Analyse der ChT-induzierten Amplitudenreduktion	25
3.1	ChT-induzierte Stromreduktion an hERG bei gleichzeitiger DTT beziehungsweise bMSRA und DTT Applikation (aus Su <i>et al.</i> , 2007)	27
3.2	Die Wirkung von 300 μ M ChT an drei verschiedenen Kaliumkanälen	28
3.3	ChT-induzierte Stromreduktion an hERG-Strömen in Neuroblastomzellen	29
3.4	Variabilität der ChT-induzierten Stromreduktion des WT in den Zellreihen 1 bis 6	30
3.5	Abhängigkeit der ChT-induzierten Stromreduktion vom HP und der Pulsfrequenz	31
3.6	Wirkung von DTT auf die Sensitivität des hERG-WT gegenüber ChT	32
3.7	Ablauf der biophysikalischen Charakterisierung von hERG-WT nach Oxidation mit ChT	32
3.8	Struktur und Wirkung von p-Toluensulfonamid auf hERG-WT	34
3.9	Skizze einer hERG α -UE	35
3.10	ChT-induzierte Stromreduktion der terminalen Deletionsmutanten von hERG	36
3.11	ChT-induzierte Stromreduktion von 11 Met-Substitutionsmutanten	37
3.12	ChT-Sensitivität der 3Met-Mutante im WT- beziehungsweise Δ N-Hintergrund	38
3.13	Diagramme des verbleibenden Stromes ($I_{200} \times 100 \%$) und der Zeitkonstanten (τ_{ChT})	39
3.14	ChT-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutanten M645L und S620T	41
3.15	ChT-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutante hEAG1/T432S/A443S	41
3.16	Effekte der Cys-Modifizierer DTNB, MTSEA und MTSES an hERG-WT	43

3.17	MTSES-Sensitivität der hERG-Ströme in Neuroblastomzellen	44
3.18	Die MTSES-Sensitivität von hKv1.5, hEAG1 und hERG im Vergleich	44
3.19	Wirkung von ChT nach dem Eintreten der MTSES-Stromreduktion	45
3.20	Skizzierte hERG α -UE mit Cys	46
3.21	MTSES-Sensitivität der Δ N- und Δ C-Deletionsmutanten im Vergleich zum WT	47
3.22	MTSES-Sensitivität der 5 intrazellulären Cys-Substitutionsmutanten	48
3.23	MTSES-Sensitivität der Kanalmutante hERG- Δ N/C723S	48
3.24	Modifikationen des Schaltverhaltens von C723S	49
3.25	Sensitivität der N-terminalen Cys-Mutanten gegenüber 1 mM MTSES	50
3.26	MTSES-Sensitivität der Kanalmutanten Δ (2-15) und Δ (2-15)/C723S	51
3.27	Veränderung des Deaktivierungsgeschwindigkeit von hERG durch 1 mM Cys-modifizierende Substanzen in Zusammenhang mit der Stromreduktion	52
3.28	Zusammenhang MTSES-Sensitivität und Deaktivierungsbeschleunigung	53
3.29	MTSES-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutanten M645L und S620T	54
3.30	ChT-Sensitivität des MTSES-unsensitiven Kanals Δ N/C723S und der 5 C-terminalen Cys	55
3.31	ChT-Sensitivität der Met-Mutanten im C723S beziehungsweise Δ N/C723S-Hintergrund	56
4.1	Wirkung endogener ROS an hERG	58
4.2	ChT-Effekte am hERG-Kanal	59
4.3	MTSES-Effekte am hERG-Kanal	64
4.4	Strukturmodell der C-Termini im HCNE2-Kanal (nach Zagotta <i>et al.</i> , 2003)	66
4.5	Positionierung der AS 713, 723 und 740 im C-Terminus von hERG in Anlehnung an das Strukturmodell des HCN2-Kanals	67
4.6	Schematische Darstellung der genomischen Struktur von hERG1a, hERG1b und Δ N-hERG	71
4.7	Modellvorstellung einer oxidativen Regulation von hERG	72

Tabelle Titel

Seite

1.1	Trivial- und Nomenklaturnamen der in dieser Arbeit erwähnten Kanäle	6
2.1	Übersicht der verwendeten Ausgangsplasmide	17
3.1	Das hERG-WT Schaltverhalten vor und nach der ChT-Modifikation (*P<0.05)	33
3.2	Biophysikalische Analyse von hERG nach MTSES/DTT Behandlung (*P<0.05)	46

1 Einleitung

1.1 Oxidative Prozesse und Reparatursysteme in der Zelle

1.1.1 Entstehung oxidierender Substanzen

Unter *reactiven oxygen species* (ROS) versteht man Sauerstoffradikale und nicht-radikalische reaktionsbereite Sauerstoffverbindungen. Die Entstehung von ROS ist nicht auf ein bestimmtes Kompartiment der Zelle beschränkt. Neben den Proteinen der Atmungskette sind auch Oxidasen und mischfunktionelle Oxygenasen an der Generierung von ROS beteiligt. Etwa 1 bis 2 % des bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien verbrauchten Sauerstoffes wird nur mit einem Elektron reduziert (Gneiger und Kuznetsov, 2002). Dadurch entstehen Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), von denen je zwei in einer spontanen Dismutation miteinander zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff reagieren können (Halliwell und Gutteridge, 1989). H_2O_2 kann entweder durch die Fenton-Reaktion in Gegenwart von zweiwertigen Eisenionen oder durch eine Reaktion mit Semichinonen das sehr reaktive Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) bilden. Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Nitridoxide gehören zu den physiologisch bedeutsamsten Sauerstoffradikalen in der Zelle. Zu der Gruppe der nicht-radikalischen reaktionsbereiten Sauerstoffverbindungen zählen unter anderem H_2O_2 , Peroxinitrit ($ONOO^-$), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Hypochlorit (OCl^-). Peroxinitrite entstehen bei einer Reaktion von Superoxidanionen mit dem durch die Oxidation von Arginin entstehenden Stickstoffmonoxid (NO). Hypochlorit wird direkt in den neutrophilen Zellen durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) gebildet und kann mit den Aminogruppen anderer Proteine zu organischen Chloraminen reagieren (Dychdala, 1991). Chloramine sind starke Oxidantien, die mit einer höheren Selektivität als OCl^- , speziell mit den schwefelhaltigen Aminosäuren (AS) der Proteine, reagieren (Peskin und Winterbourn, 2001).

1.1.2 ROS und Schutzmechanismen

ROS und *reactive nitric species* (RNS) sind von großer physiologischer Relevanz, da sie als Signalmoleküle fungieren können und an der Fremdkörperabwehr beteiligt sind. So setzen beispielsweise Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) frei. Eine durch NO ausgelöste Signalkette führt zur Relaxation der glatten Muskelzellen und damit zur Vasodilatation der Blutgefäße (Palmer *et al.*, 1987, 1988). Makrophagen und neutrophile Granulozyten erzeugen $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO und OCl^- um Mikroorganismen abwehren zu können (Halliwell und Gutteridge, 1989). ROS können aber auch pathophysiologische Folgen haben, indem sie über Kettenreaktionen die Schädigung bioaktiver Moleküle bewirken. Um das zu verhindern, haben aerobe Zellen antioxidative Schutzmechanismen entwickelt. Als antioxidative Substanzen werden Enzyme und nicht-enzymatische Gruppen bezeichnet, die die Bildung von ROS verhindern, ROS neutralisieren oder Reparaturvorgänge fördern (Bild 1.1).

Als antioxidative nicht-enzymatische Substanzen fungieren die Vitamine A, E und C, Bilirubin, Thioredoxin (TR) und Glutathion (GSH). Letzterem kommt eine besondere Bedeutung beim Erhalt des Thiol-Redox-Potentiales der Zelle zu, da es die Sulfhydrylgruppen (SH) von Proteinen im reduzierten Zustand hält (Cotgreave und Gerdes, 1998). Bilirubin ist ein Abbauprodukt der Häm-Gruppe, welches, gleich dem Vitamin C, im Plasma als Radikalfänger fungiert. Zu den antioxidativen Enzymen zählen vor allem Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (KAT) und Glutathionperoxidase (GSH-Peroxidase).

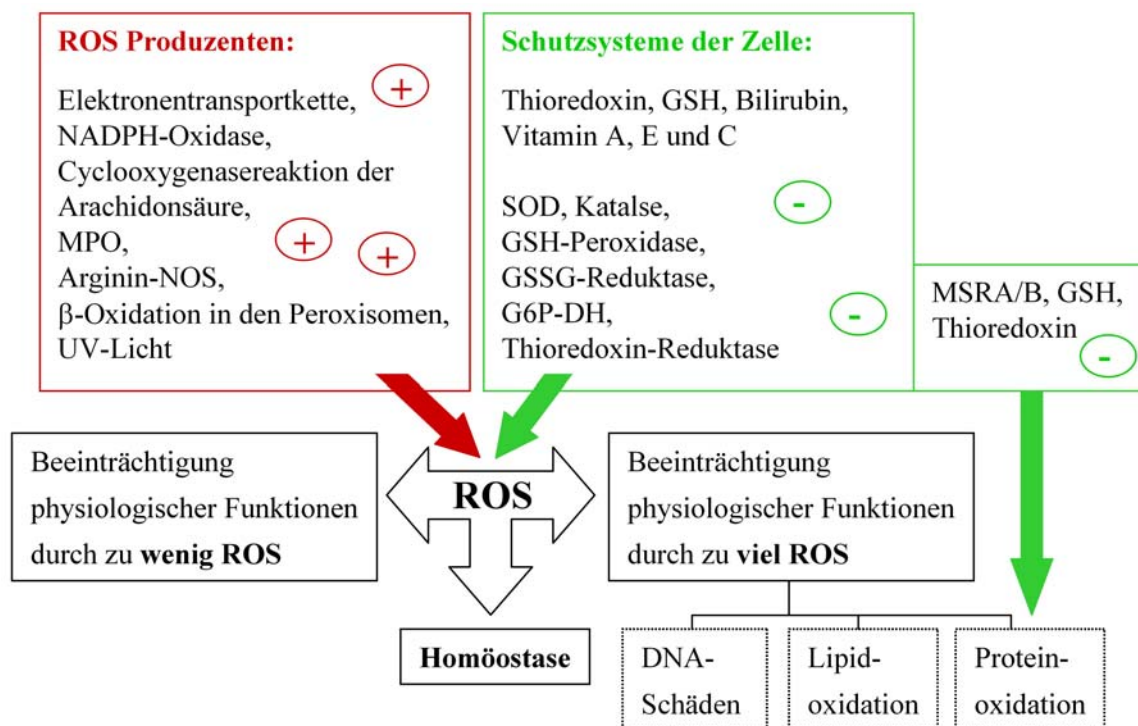


Bild 1.1: Übersicht einiger ROS-produzierender und ROS-neutralisierender Prozesse und Substanzen

SOD und KAT überführen Superoxidanionen beziehungsweise H_2O_2 über Dismutationen in molekularen Sauerstoff und Wasser. GSH-Peroxidasen beseitigen Peroxidmoleküle und H_2O_2 durch Oxidation von GSH. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wiederum wird über die Glutathionreduktase (GSSG-Reduktase) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) durch NADPH-abhängige Reaktionen reduziert. Ein weiterer Elektronenüberträger ist das Thioredoxin (TR), dessen Regeneration von der NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase (TRR) katalysiert wird. Eine Zunahme von ROS in der Zelle führt zu einer Akkumulation oxidierten Proteins. Alle AS können durch Oxidation irreversibel modifiziert werden (Berlett und Stadtman, 1997) und oft führt dies zu einem Funktionsverlust und Abbau des betreffenden Proteins. Besonders empfindlich gegenüber ROS sind die schwefelhaltigen AS. Gleichzeitig sind aber Methionin (Met) und Cystein (Cys) die einzigen AS, für die zelleigene Reparaturenzyme bekannt sind. Eine Oxidation von Cys zu

Disulfiden kann durch das TR/TRR-System wieder reduziert werden. Solche Disulfide können entweder aus zwei Cys bestehen oder gemischte Disulfide aus Cys und einem GSH, Homocystein oder γ -Glutamylcystein-Molekül bilden. Die in einem weiteren Oxidationsschritt entstehende Sulfinsäure kann durch das Enzym Sulfiredoxin wieder reduziert werden (Biteau *et al.*, 2003). Oxidationen zu den jeweiligen Sulfonsäuren gelten sowohl für Cys als auch für Met als irreversibel. Werden Met in Proteinen zu Sulfoxiden oxidiert, entsteht eine Mischung der Diastereomere Met-S-O und Met-R-O (Sharov *et al.*, 1999, Sharov und Schöneich, 2000). Eine Reduktion der Sulfoxide kann über die Methionin-Sulfoxid-Reduktase A (MSRA) für Met-S-O und über die Methionin-Sulfoxid-Reduktase B (MSRB) für Met-R-O erfolgen. Die Elektronen beider Enzyme werden über das TR/TRR-System regeneriert (Weissbach *et al.*, 2005).

Die Oxidation eines bestimmten Met kann zum Funktionsverlust des Proteins führen, wie für das Met 358 im α -Antitrypsin gezeigt wurde (Johnson und Travis, 1979). Bei anderen Proteinen hingegen hat die Oxidation mehrerer, vorwiegend an der Proteinoberfläche exponierter Met, keinen Funktionsverlust zur Folge. So wurde für die bakterielle Glutamin-Synthetase gezeigt, dass mehrere Met das katalytische Zentrum umgeben und dieses vermutlich vor oxidativem Stress schützen (Levine *et al.*, 1996).

1.1.3 Redoxstatus, oxidativer Stress und Krankheiten

Die Gesamtheit der Reduktionspotentiale und Reduktionskapazitäten aller in einer Zelle vorhandenen Redoxpaare wird als Redoxstatus bezeichnet (Schafer und Buettner, 2001). Einen großen Einfluss auf den Redoxstatus einer Zelle hat unter anderem das Verhältnis von GSH zu GSSG. Unter physiologischen Bedingungen kommt GSH im Zytosol in Konzentrationen von bis zu 11 mM vor (Smith *et al.*, 1996). Durch exogene Einflüsse, wie Umweltgifte und UV-Strahlung oder durch pathologische Prozesse, kommt es zur vermehrten Bildung von ROS und dem damit verbundenen Ungleichgewicht des Redoxstatus. Eine verstärkte Ausbildung gemischter Disulfide mit GSH wird als früher Schutzmechanismus der Zellen gegen ROS beschrieben (Thomas *et al.*, 1995). Wenn die zelleigenen Schutzmechanismen den Abbau von ROS nicht mehr ausreichend bewerkstelligen können, spricht man von oxidativem Stress. Dieser kann durch ein Ungleichgewicht zwischen der SOD und den Enzymen KAT und GSH-Peroxidase hervorgerufen werden. Die Pathogenese vieler Erkrankungen wie beispielsweise Darmkrebs (Babbs, 1990), Diabetes mellitus (Baynes *et al.*, 1999), Morbus Alzheimer (Good *et al.*, 1996) und Morbus Parkinson (Adams und Odunze, 1991) wird mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht. So wurde gezeigt, dass in den Gehirnen von Alzheimerpatienten eine höhere Anzahl oxidierten Proteine vorliegt (Gabbita *et al.*, 1999) und dass der GSH-Gehalt in den Dopamin-Neuronen von Parkinsonpatienten um bis zu 60 % reduziert ist (Ebadi *et al.*, 1996).

1.1.4 Oxidativer Stress im Herzen

Oxidativer Stress spielt auch eine Rolle in der Pathogenese vieler Herzkrankheiten. Zu einer verstärkten Bildung von ROS kommt es bei Patienten mit Atherosklerose, Herzinfarkt, Bluthochdruck, Herzfehler und Herzoperationen (Steinbrecher *et al.*, 1990, Harrison, 1997, Witztum *et al.*, 1991, Ide *et al.*, 2000, Clermont *et al.*, 2002). Im Verlauf oder als Spätfolge dieser Krankheiten kommt es zu einer zeitlich und örtlich begrenzten Unterversorgung kardialer Zellen (Myokardischämie). Bei Herzinfarkten und Herzoperationen erfolgt nach der Ischämie ein Wiedereinsetzen des Blutstromes, die so genannte Reperfusion. Ischämie und Reperfusion führen zu Störungen des oxidativen Metabolismus sowie zu einer verstärkten Freisetzung von H_2O_2 , Superoxidanionen und Hydroxylradikalen (Becker *et al.*, 1999, Nohl, 1987, Vanden-Hoek *et al.*, 1997, Ambrosio *et al.*, 1993). Auf biochemischer Ebene führen Ischämie und Reperfusion zu einer Akkumulation von Laktat, H^+ , Lysophosphoglyceriden (LPG), Arachidonsäure (AA), FS-Akylkarnithin (LCAC) und ROS. Es kommt zu einem Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses und der Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen. Kalium und H^+ akkumulieren in der extrazellulären Matrix, während es intrazellulär zu einem Anstieg von Ca^{2+} , Na^+ und H^+ kommt. Diese Veränderungen der Ionenkonzentrationen beruhen auf Funktionsmodulationen der ATP-asen, Ionenaustauscher und Ionenkanäle.

Die Effekte von ROS auf die kardialen Ionenkanäle lassen sich auf Organebene nur vor dem Hintergrund der ischämischen Begleiterscheinungen betrachten. So akkumulieren neben ROS auch H^+ und LCAC in den *gap-junctions*. Dies führt zu einer Inhibierung der *gap-junctions* und der damit verbundenen verminderten Erregungsweiterleitung im Herzen (Carmeliet, 1999). Die genannten Faktoren tragen auch zur Öffnung unselektiver Kationenkanäle bei, was zu einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie zu einer internen Akkumulation von Ca^{2+} und Na^+ führt. Die meisten Kaliumkanäle, mit Ausnahme der ATP- und AA-induzierten Kanäle, werden unter ischämischen Bedingungen inhibiert. Die Aktivierung dieser Kanäle wird durch ROS, Azidose und mechanische Dehnung hervorgerufen. Die interne Ca^{2+} -Konzentration wird durch eine ROS-bedingte Aktivierung der Ca^{2+} -Freisetzungskanäle im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) noch weiter erhöht. Ein starker intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg wiederum ist verbunden mit Nachdepolarisationen, einer spontanen Aktivität der Purkinje-Zellen und einer reduzierten Aktivität der *gap-junctions* (Carmeliet, 1999). Wie sich oxidativer Stress letztendlich auf das Aktionspotential (AP) des Herzens auswirkt, hängt von der Dauer und dem Eintrittspunkt von Ischämie und Reperfusion sowie von der Art der generierten ROS ab. Während einer milden Ischämie (5 min) wird eine, durch Hyperkaliämie bedingte, Verkürzung der Aktionspotentialdauer (APD) beschrieben. Erfolgt die Reperfusion innerhalb von 10 bis 20 min, so führt dies zum Absinken des Membranpotentials (MP) und einer Verlängerung der APD (Carmeliet, 1999). Diese Veränderungen am AP führen je nach Aus-

prägungsgrad zu Arrhythmien (Opie und Clusin, 1990). Bei andauernder Ischämie tragen ROS zum Anschalten der Apoptosesignalwege, dem Öffnen mitochondrialer Mega-Kanäle, einer verstärkten Peroxidation der Membranlipide sowie zur Entstehung myokardialer Nekrosen bei (zur Übersicht: Murphy und Steenbergen, 2008).

Auch im kardiovaskulären System sind ROS an der Entstehung von Dysfunktionen beteiligt. In den Endothelzellen führen ansteigende Konzentrationen des Superoxidanions zu einer Abnahme an NO und der NO-Synthase (NOS). Eine Senkung der anti-inflammatorischen und vasodilatorischen Effekte von NO fördert die Entstehung von Bluthochdruck und Herzinfarkt (Papaharalambus und Griendling, 2007). ROS sind also auch an der Verschlechterung der Herzfunktion bei nicht-ischämischen Kardiomyopathien beteiligt (Singal *et al.*, 1998). Störungen des Lipidmetabolismus führen zusammen mit einer Zunahme an Superoxidanionen zur Akkumulation von oxidiertem *low density lipoprotein* (LDL), welches die Artherosklerose fördert (Harrison, 1997). Eine Manifestation der Artherosklerose an den Koronararterien kann im weiteren Krankheitsverlauf zur Myokardischämie und zu Arrhythmien führen (Erdmann, 2000).

1.1.5 Oxidative Modifikation von Kaliumkanälen

Die wesentlichen, an der Ausprägung des AP im Herzen beteiligten, Kaliumkanäle gehören den Klassen der einwärts-gleichrichtenden Kanäle und der spannungsabhängigen Kanäle (Kv-Kanäle) an. Oxidationen von Kaliumkanälen wurden in unterschiedlichen Systemen und mit verschiedensten ROS-produzierenden Substanzen untersucht. Dabei zeigten Kv-Kanäle meist eine Abnahme der Kanalaktivität (zur Übersicht: Kourie, 1998). Dies könnte zur Generierung der bei Ischämie und Reperfusion beobachteten Depolarisation der Membran und damit zur Ausbildung von Arrhythmien beitragen. Einige Arbeiten zeigen, dass eine Hypoxie ohne metabolische Restriktion mit einer Abnahme der ROS verbunden ist (Michelakis *et al.*, 2004, Weir und Archer, 1995, Hool, 2004). Daher können reduzierende Substanzen den gleichen Effekt am jeweiligen Kanal hervorrufen wie Hypoxie. Für den *G protein-regulated inwardly rectifying K⁺*-Kanal (GIRK-Kanal) wurde gezeigt, dass neben der über G-Proteine vermittelten Aktivierung auch Hypoxie und DTT zu einer Aktivierung des Kanals führen. Eine Induktion des GIRK-Stromes unter solchen leicht-hypoxischen Bedingungen ($pO_2 = 17$ mmHg) könnte zu einer Verringerung der allgemeinen Zellerregbarkeit beitragen (Zeidner *et al.*, 2001).

Eine Modulation der Ionenkanäle durch ROS kann sowohl über eine Peroxidation der Membranlipide oder eine Aktivierung von Signalkaskaden, als auch durch eine direkte Oxidation/Reduktion spezifischer Reste am Kanal generiert werden. Eine solche direkte Modifikation der oxidativ-sensitiven AS Cys und Met wurde in den folgenden Arbeiten beschrieben: Über Cys vermittelte Modifikationen der Schalteigenschaften wurden für neuronale Kaliumkanäle, den GIRK-Kanal und den *big conductance*-Kanal (BK-Kanal) gezeigt (Ruppersberg *et al.*, 1991, Stephens *et al.*, 1996, Heinemann *et al.*, 1995,

Zeidner *et al.*, 2001, Zhang und Horrigan, 2005). Über Met vermittelte Effekte an Kaliumkanälen wurden für den *ShakerC/B*-Kanal (ShC/B) und den BK-Kanal gezeigt (Ciorba *et al.*, 1997, Santarelli *et al.*, 2006). Bei ShC/B führt die Oxidation eines N-terminalen Met zur Verlangsamung der Inaktivierung. Eine MSRA vermittelte Reduktion des Met-O zu Met unterstützt die schnell-inaktivierenden Kanaleigenschaften. Der BK-Kanal generiert unter oxidativen Bedingungen eine gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit, die auf der Modifikation dreier Met beruht.

1.2 Kaliumkanäle in der tierischen Zelle

In allen bisher untersuchten Organismen und Zelltypen wurden Kaliumkanäle gefunden. Sie regulieren verschiedenste physiologische Funktionen. So sind Kaliumkanäle unter anderem an der Sekretion exokriner Drüsen, der Regulation des Blutdruckes und an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt (zur Übersicht: Tang *et al.*, 2004).

1.2.1 Nomenklatur der Kaliumkanäle

Die Klassifizierung und Nomenklatur der Ionenkanäle nach der *IUPHAR*-Nomenklatur beruht auf den funktionellen und phylogenetischen Beziehungen der Kanäle zueinander (Gutmann *et al.*, 2005). Zusätzlich haben sich für die meisten Kanäle Trivialnamen eingebürgert. So werden die in dieser Arbeit besonders relevanten Kanalproteine in der Literatur nahezu ausschließlich als EAG-Kanal (für: *ether-a-gogo gene*) und ERG-Kanal (für: *ether-a-gogo related gene*) bezeichnet (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Trivial- und Nomenklaturnamen der in dieser Arbeit erwähnten Kanäle

Trivialnamen	Organismus	Kanalgene nach <i>IUPHAR</i>	Kanalgene nach <i>HUGO</i>
hEAG1/hEAG	<i>Homo sapiens</i>	Kv10.1	KCNE1
hERG1/hERG	– –	Kv11.1	HCNE2
Kv1.5	– –	Kv1.5	KCNA5
RCK4/Kv1.4	– –	Kv1.4	KCNE4
BK/hSlo	– –	K _{Ca} 1.1	KCNMA1
GIRK1/4	– –	Kir3.1/Kir3.4	KCNJ3/KCNJ5
ShC/B	<i>Drosophila melanogaster</i>	Spleißvariante von Kv1	-
ShBA(6-46)	– –	Kv1-Mutante mit zerstörter N-Typ Inaktivierung	-
KcsA	<i>Streptomyces lividans</i>	-	-
MthK	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	-	-
KvAP	<i>Aeropyrum pernix</i>	-	-
KirBac	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-

Die Namensgebung dieser Kanäle erfolgte in Anlehnung an den Phänotyp einer *Drosophila*-Mutante. Wenn diese Mutante Diäthyler-Dämpfen ausgesetzt wurde, dann fingen deren Beine an zu zittern (Baumann *et al.*, 1987, Kamb *et al.*, 1987, Papazian *et al.*, 1987).

1.2.2 Allgemeine Struktur

Die ersten Vorstellungen einer Kaliumkanal-Porenregion basierten auf der Röntgenstrukturanalyse des bakteriellen KcsA-Kanals (Doyle *et al.*, 1998, Clapham, 1999, Zhou *et al.*, 2001). Kurz darauf folgten die Strukturanalysen des Ca^{2+} -gesteuerten Kaliumkanals MthK und des spannungsgesteuerten KvAP-Kanals (Kuo *et al.*, 2003, Jiang *et al.*, 2002, 2004).

Als generelle Grundstruktur aller Kaliumkanäle gilt der Aufbau aus vier α -Untereinheiten, die in ihrer Mitte den Ionenpermutationsweg ausbilden. Jede dieser α -Untereinheiten (α -UE) besteht aus mindestens zwei membrandurchgängigen (TM) Segmenten, die durch einen sich teilweise in die Membran zurückfaltenden Bereich (*pore-loop*) miteinander verbunden sind (Choe *et al.*, 2002). Dieser *pore-loop* enthält die in nahezu allen Kaliumkanälen hochkonservierte AS-Sequenz TXXTXGYGD (Heginbotham *et al.*, 1992, 1994). Bei einer tetrameren Anordnung der zwei TM-Segmente bildet die TXXTXGYGD-Sequenz den Selektivitätsfilter aus. Dieser ist für die sehr hohe Kaliumselektivität sowie für die hohen Durchgangsraten von bis zu 10^{6-8} Ionen pro Sekunde verantwortlich. Neben diesen allgemeinen Merkmalen weisen die meisten Kaliumkanäle zusätzliche Bauelemente auf.

So enthalten die α -UE der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) die vier weiteren Segmente S1, S2, S3 und S4. Die zwei porenbildenden Segmente werden als S5 und S6 bezeichnet. Das vierte Segment trägt positive AS in jeder dritten Position und fungiert vermutlich als Spannungssensor, dessen Depolarisation zu einer Bewegung des Segmentes durch die Membran führt (Trudeau *et al.*, 1995, Warmke und Ganetzky, 1994). Anscheinend findet die Bewegung von S4 in Richtung extrazelluläre Matrix statt und ist an das Öffnen des Kanals gekoppelt. Öffnet die Pore, vollführen die S6-Helices eine Drehung und knicken an der Position eines so genannten *gating-hinges* auseinander (Yifrach und MacKinnon, 2002). Die Strukturanalyse des KvAP-Kanals zeigte überdies, dass nicht alle Segmente der Kv-Kanäle vollständig membrandurchgängig ausgerichtet sind und vermutlich S3 zusammen mit S4 als Spannungssensor fungiert (Jiang *et al.*, 2002).

Neben den α -UE können für Struktur und Funktion der Kaliumkanäle auch kleine assoziierte Proteine, so genannte β -UE, wichtig sein.

1.3 Der hERG-Kanal

Innerhalb der Klasse der Kv-Kanäle gibt es die Familie der EAG-Kanäle und deren Unterfamilie die ERG-Kanäle. Im menschlichen Organismus werden ERG-Kanäle von drei ver-

schiedenen Genen (*erg1-3*) kodiert, wobei *erg1* der von Warmke und Ganetzky 1994 zuerst beschriebenen Variante entspricht. Die in dieser Arbeit für das Kanalprotein verwendete Bezeichnung hERG geht auf die Sequenz von *erg1* zurück. Am besten charakterisiert ist hERG im Herzen (Tseng, 2001), wo die durch diesen Kanal generierten Ströme I_{Kr} (für: Strom (I) Kalium *rapid*) zur Repolarisation des AP beitragen.

1.3.1 Aufbau und molekulare Funktionsprinzipien

Charakteristisch für hERG - im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen - ist ein verlängertes Verbindungsstück zwischen S5 und dem Bereich des *pore-loop* (Bild 1.2). Es wird angenommen, dass dieses Verbindungsstück (AS 583-598, nach Xu *et al.*, 2003) eine kurze Helix ausbildet. Diese so genannte *turret*-Helix scheint für die Inaktivierungseigenschaften des Kanals wichtig zu sein (Torres *et al.*, 2003) und als Bindestelle für einige hERG-spezifische Toxine zu fungieren (Pardo-Lopez *et al.*, 2002). Eine weitere Besonderheit ist das Vorhandensein eines „**GFG**“-Motivs innerhalb der für alle anderen Kaliumkanäle typischen „**TXXTXGYGD**-Sequenz“ (gelbe Linie in Bild 1.2). Im Bereich der AS 26 bis 135 weist hERG Sequenzhomologien zu den PAS-Domänen anderer Proteine auf (Ponting und Aravind, 1997, Morais-Cabral *et al.*, 1998). Im C-Terminus des Kanals, im Bereich der AS 750 bis 870 (Akhavan *et al.*, 2005), befindet sich eine zyklische Nukleotid-Bindedomäne (cNBD).

hERG-Kanäle, die aus vier hERG α -UE (*erg1*) bestehen, generieren einen dem I_{Kr} -Strom ähnlichen, aber nicht identischen Strom. Es wird angenommen, dass im nativen Gewebe heteromere Komplexe aus *erg1*, *erg2*, *erg3* und *erg1b* gebildet werden (Shi *et al.*, 1997). Die Sequenz von hERG1b stimmt, bis auf den nur aus 29 AS bestehenden N-Terminus mit der von hERG überein. Es wird hypothetisiert, dass hERG1a und hERG1b während der Translation heteromere Komplexe ausbilden. Diese heteromeren Komplexe generieren hERG-Ströme mit einer beschleunigten Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik und wurden in Neuroblastom- und Leukämiezelllinien gefunden (Robertson *et al.*, 2005, Larsen *et al.*, 2008). Der im Herzen wichtige I_{Kr} -Strom wird überwiegend von homomeren hERG1a-Kanälen erzeugt (Phatiyal *et al.*, 2007, Larsen *et al.*, 2008).

Die Rolle der akzessorischen β -UE MirP1 und MinK bei der Erzeugung des nativen I_{Kr} -Stromes wird kontrovers diskutiert (Cui *et al.*, 2001, Abbott und Goldstein, 2001, Weerapura *et al.*, 2002, Finley *et al.*, 2002, Pourrier *et al.*, 2003).

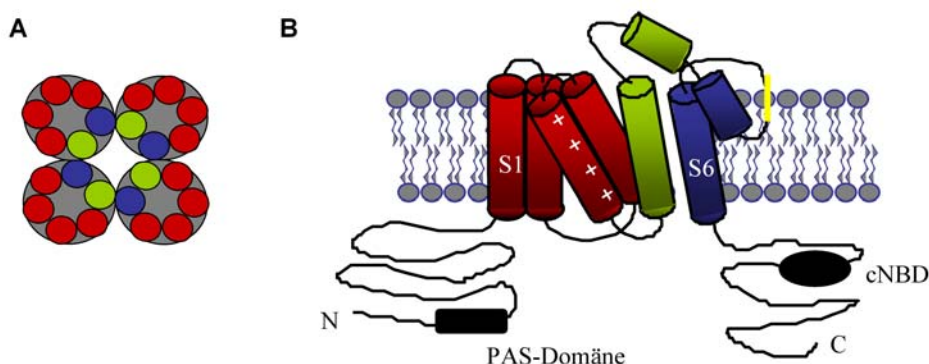


Bild 1.2: Schematische Darstellung der hERG α -UE (angelehnt an Jiang *et al.*, 2005)

(A) Vier hERG α -UE assemblieren zu einem Tetramer, das den zentralen Ionenpermeationsweg des Kanals bildet. Dabei sind jeweils die S1-4 rot, S5 grün und S6 blau markiert. (B) Einzelne α -UE, senkrecht in die Membran eingelagert dargestellt. S4 enthält positive Ladungen. S5 und die *turret*-Helix sind grün markiert, während S6 und der als kurze Helix dargestellte *pore-loop* blau dargestellt sind. Die gelbe Linie kennzeichnet den Selektivitätsfilter mit dem GFG-Motiv.

1.3.1.1 Aktivierung und Deaktivierung

Die langsame Aktivierung von hERG erfolgt bei einer Depolarisierung der Zellmembran. Die elektromechanische Kopplung zwischen der Bewegung des Spannungssensors (S4) und der Kanalaktivierung wird durch eine Interaktion des S4-S5-Verbindungsstückes mit Resten des C-terminalen Endes von S6 vermittelt (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002, Ferrer *et al.*, 2006). Das Öffnen der Pore erfordert, wie bei anderen Kaliumkanälen auch, flexible S6-Segmente. Diese Flexibilität wird bei hERG jedoch nicht über Glycinreste des S6 vermittelt. Anscheinend fungieren in hERG andere, noch nicht identifizierte AS als *gating-hinges* (Hardman *et al.*, 2007). hERG weist gegenüber Kaliumkanälen die schneller aktivieren, einige zusätzliche negativ geladene AS in S2 und S3 auf, die vermutlich direkt zu der von S4 wahrgenommenen Gesamtladung beitragen (Seoh *et al.*, 1996).

Membranspannungen unter -80 mV führen zur Schließung des Kanals. Die für hERG typische langsame Deaktivierung wird hauptsächlich über den N-Terminus vermittelt. Als Modell für diese langsame Deaktivierungskinetik wird eine Interaktion des N-Terminus mit dem S4-S5-Verbindungsstück angenommen (Wang *et al.*, 1998). Deletionen im N-Terminus bewirken eine Beschleunigung der Deaktivierung (Schönherr und Heinemann, 1996). Dabei ist schon eine minimale Deletion der AS 2-9 ausreichend, um Kanäle mit einer beschleunigten Deaktivierungskinetik zu erzeugen (Morais-Cabral *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein hydrophobes Cluster im N-Terminus zur Verlangsamung der Deaktivierung beiträgt und ein negativer Rest in Position 411 eine Stabilisierung des geschlossenen Zustandes generiert (Ferrer *et al.*, 2006). Da eine Reduktion des extrazellulären pH-Wertes oder eine externe Applikation von DEPC zu einer schnelleren Deaktivierungsrate führen, wird vermutet, dass die Deaktivierungskinetik von hERG auch über extrazelluläre AS moduliert wird (Jiang *et al.*, 1999, Anumonowo *et al.*, 1999).

1.3.1.2 Inaktivierung und Rückkehr von der Inaktivierung

Geöffnete hERG-Kanäle gehen bei anhaltenden depolarisierenden Spannungen in einen inaktivierten Zustand über. Die Inaktivierung von hERG ist sehr schnell und spannungsabhängig (Smith *et al.*, 1996). Es wird eine so genannte C-Typ-Inaktivierung hypothesisiert, bei der Konformationsänderungen um den Selektivitätsfilter herum zu einer Blockierung des Kanals führen. Viele Reste im verlängerten Verbindungsstück zwischen S5 und S6 (Bild 1.2) determinieren die Inaktivierungseigenschaften und die ausgeprägte Kaliumselektivität des Kanals (Fan *et al.*, 1999, Pardo-Lopez *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2002). Besonders prägnant sind Mutationen an Ser 620 (Herzberg *et al.*, 1998, Ficker *et al.*, 2001) und Ser 631 (Schönherr und Heinemann 1996, Smith *et al.*, 1996), die beide zu einer vollständigen Verhinderung der Inaktivierung im physiologischen Spannungsbereich führen. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wird hauptsächlich über bestimmte Reste in S4 determiniert (Piper *et al.*, 2005).

Während der Depolarisation sind viele Kanäle inaktiviert, es fließt also nur wenig Strom. Bei nachfolgender Repolarisation gehen die Kanäle von dem inaktivierten Zustand über den offenen Zustand in den geschlossenen Zustand über. Diese Rückkehr von der Inaktivierung ist ein schneller Prozess, während die Deaktivierung von hERG langsamer verläuft. Daher können die Kanäle im offenen Zustand viel Strom generieren, bevor sie wieder schließen. Im physiologischen Spannungsbereich führt dies zu großen Auswärtsströmen. Im Rahmen elektrophysiologischer Experimente kann hERG-Strom bei Spannungen unterhalb des Kalium-Umkehrpotentials auch als Einwärtsstrom gemessen werden.

1.3.2 Pharmakologische Eigenschaften des Kanals

Antiarrhythmika der Klasse III werden üblicherweise zur Verlängerung der ventrikulären Refraktärzeit verwendet. Bei einigen Patienten führt diese Medikation jedoch zu einer Blockierung des hERG-Kanals und damit zu einer pathologischen Verlängerung des AP. Besonders unter Stress, wenn die APD durch den gesteigerten Ca^{2+} -Einfluss verlängert ist, können weitere AP-Verlängerungen zu letalen ventrikulären Tachykardien führen. Auch für viele andere pharmazeutische Substanzen wurde gezeigt, dass sie hERG blockieren. Dazu gehören Histaminrezeptor-Antagonisten, neuroleptische Substanzen (Suessbrich *et al.*, 1996, 1997), Ca^{2+} -Kanal-Blocker (Chouabe *et al.*, 1998) und die in der Diabetes-Therapie verwendeten $\text{K}_{(\text{ATP})}$ -Kanal-Blocker (Rosati *et al.*, 1998). hERG wird im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen wesentlich stärker durch pharmakologische Substanzen der unterschiedlichsten Klassen blockiert. Einige der strukturellen Besonderheiten des Kanals wurden als Determinanten dieser hohen Sensitivität identifiziert. Es scheint, dass der innere und äußere Porenbereich von hERG größer ist als bei anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen, so dass ein Einschließen des Blockermoleküls in der Porenregion möglich ist. In der Kanalpore kann das Blockermolekül über eine direkte Inter-

aktion an die Reste Tyr 652 und/oder Phe 656 gebunden sein, die nur im S6 der Kanäle der EAG-Familie vorkommen. Die Affinität einiger anderer Blocker korreliert mit den Inaktivierungseigenschaften des Kanals. Es wird angenommen, dass die allosterischen Veränderungen während der Inaktivierung zu einer stärkeren oder schwächeren Affinität bestimmter Blocker führen. Andere Substanzen, wie zum Beispiel das Fungizid Ketokonazol, blockieren auch geschlossene Kanäle (Dumaine *et al.*, 1998). Folglich kann eine Blockierung der hERG-Ströme über unterschiedliche Mechanismen und Strukturen vermittelt werden (Thomas *et al.*, 2006).

1.3.3 Regulationsmechanismen

Physiologische Regulationen eines Ionenkanals können sowohl über die Modulation seiner elektrophysiologischen Eigenschaften erfolgen, als auch durch Veränderungen der Reifungs-, Transport- oder Abbauprozesse des Kanalproteins hervorgerufen werden. Einige auf den hERG-Strom vermindernd (grauer Hintergrund) beziehungsweise aktivierend (weißer Hintergrund) wirkende Substanzen sind in Bild 1.3 gezeigt.

Die Regulation von hERG durch externe Ca^{2+} -Konzentrationen geschieht vermutlich über das S3-S4-Verbindungsstück und führt zu allosterischen Veränderungen der Aktivierungseigenschaften des Kanals (Johnson *et al.*, 2001). Ein Absenken des extrazellulären pH-Wertes auf 6.4 führt zu einer Verringerung der hERG-Amplitude und zu einer Beschleunigung der Deaktivierung. Dies würde den während der Repolarisierungsphase fließenden Strom reduzieren und könnte zu einer Modifikation des AP beitragen. Eine Azidose des Blutplasmas ist als Begleiterscheinung bei myokardialer Ischämie und Reperfusion beschrieben und trägt zur Ausbildung von Arrhythmien bei (Orchard und Kentish, 1990). Für AA und Docosahexaensäure (DHA) wurde gezeigt, dass sie hERG in physiologisch relevanten Konzentrationen blockieren (Guizy *et al.*, 2005). Arrhythmien treten bei genetisch prädisponierten Patienten häufig in Stresssituationen auf (Priori *et al.*, 1997). Durch eine Stimulation des Sympathikus kommt es zur Aktivierung der α - und β -adrenergen Rezeptoren im Herzen (Lameris *et al.*, 2000). Die Stimulation α -adrenerger Rezeptoren reduziert den hERG-Strom über eine indirekt durch die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) vermittelte Phosphorylierung des Kanals (Thomas *et al.*, 2004). Intrazelluläres PIP_2 hingegen führt über eine direkte Interaktion des PIP_2 -Moleküls mit dem Bereich AS 883-894 zu einem Zuwachs an hERG-Strom (Bian *et al.*, 2001). Eine β -adrenerge Aktivierung führt über die Stimulation der Adenylatcyclase (AC) zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert den Kanal und reduziert damit den Strom (Thomas *et al.*, 2004, Karle *et al.*, 2002). Für eine direkte Interaktion von cAMP mit der Nukleotidbindestelle von hERG wurden nur leicht aktivierende Effekte oder keine Effekte am hERG-Strom beobachtet (Cui *et al.*, 2000).

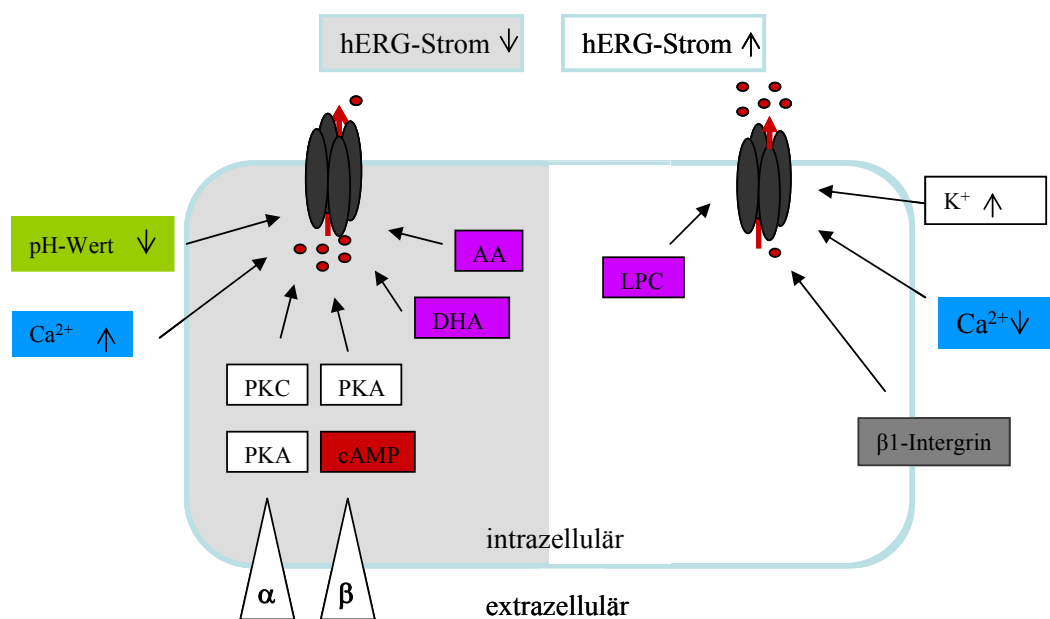


Bild 1.3: Regulationsmechanismen an hERG

Die Aktivierung α - und β -adrenerger Rezeptoren führt indirekt über die Proteinkinasen PKA und PKC zu einer Verminderung des hERG-Stromes. Eine Absenkung des pH-Wertes sowie Steigerungen der Gehalte an extrazellulärem Ca^{2+} , intrazellulärer Arachidonsäure (AA) und Docosahexaensäure (DHA) reduzieren den hERG-Strom. Einen aktivierenden Effekt auf hERG haben Lysophosphatidylcholin (LPC), die Aktivierung von $\beta 1$ -Integrinen sowie eine Absenkung des extrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und ein Anstieg des extrazellulären K^{+} -Spiegels.

Lysophosphatidylcholine (LPC) akkumulieren während Ischämie oder diabetischer Kardiomyopathie im Herzen (Kinnaird *et al.*, 1988). Hohe LPC Konzentrationen gehen mit einer externen Akkumulation von Kalium und einer Verkürzung der APD einher (Corr *et al.*, 1987, 1979, Man *et al.*, 1988). Diese Symptome lassen sich mit einem positiven Effekt von LPC auf den hERG-Kanal erklären. LPC führt zu einer Zunahme der Leitfähigkeit, einer Aktivierung des Kanals bei negativeren Spannungen und zu einer verlangsamten Inaktivierungskinetik. Da LPC mit einer Anzahl von 16 Kohlenstoffatomen den stärksten Effekt aufweist, wird eine spezifische Binderegion solcher Fettsäuren an hERG angenommen (Wang *et al.*, 2001, 2004). Dabei lässt sich der aktivierende Effekt von LPC durch die Zugabe von Vitamin E noch verstärken. Dies deutet darauf hin, dass durch LPC produzierte Superoxidanionen den hERG-Strom zwar reduzieren, aber der aktivierende Effekt einer direkten Interaktion mit LPC überwiegt.

Eine Aktivierung von $\beta 1$ -Integrin durch Fibronectin führt in Neuroblastomzellen zu einer Aktivierung des hERG-Stromes (Arcangeli *et al.*, 1996). Es wird hypothetisiert, dass diese Kanalaktivierung erforderlich ist, um spezifische Tyrosinkinasen und GTPasen des Adhäsions-abhängigen Signalweges zu modulieren (Cherubini *et al.*, 2005).

1.3.4 Physiologische Bedeutung

Die charakteristische schnelle Inaktivierung und langsame Deaktivierung sind die Grundvoraussetzungen für die physiologische Rolle von hERG im Herzen. hERG wurde als der Kanal identifiziert, der den hauptsächlich an der Repolarisierung des AP beteiligten I_{Kr} -Strom generiert (Sanguinetti *et al.*, 1995). Dass hERG bei stark depolarisierenden Potentialen nur sehr geringe Auswärtsströme erzeugt begünstigt die Plateauphase des AP. Die Dauer der Plateauphase ist entscheidend, um einen ausreichenden Ca^{2+} -Einstrom für die Kontraktion des Herzens zu gewährleisten. Je schwächer die Depolarisierung im Laufe dieser Plateauphase wird, umso mehr hERG-Kanäle kehren von der Inaktivierung zurück und generieren den für eine schnelle und vollständige Rückbildung der Erregung essentiellen repolarisierenden Strom (Bild 1.4).

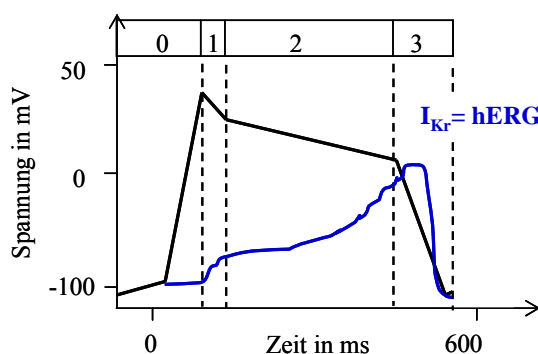


Bild 1.4: Schematische Darstellung der vier Phasen eines AP in den Purkinje Fasern des Herzens

Phase 0: schneller Na^{+} -Einstrom; Phase 1: initiale Spitze und durch I_{to} generierte frühe Repolarisation; Phase 2: Plateau, getragen durch langsamen Ca^{2+} -Einstrom; Phase 3: Repolarisierung durch den I_{Kr} -Strom. Der I_{Kr} -Strom (hERG) ist als blaue Linie dargestellt (Skizze angelehnt an Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006).

Wenn der durch hERG vermittelte I_{Kr} -Strom durch Mutationen oder durch ungünstige medikamentöse Beeinflussung inhibiert wird, führt das zu einer Verlängerung der APD. Im Elektrokardiogramm (EKG) wird dies sichtbar anhand eines verlängerten QT-Intervalles, was auch als *long-QT-syndrom* (LQTS) bezeichnet wird (Bild 1.5). Beim LQTS treten besonders bei psychischen und physischen Belastungen Kammertachykardien auf. Für die betroffenen Patienten führt sowohl die genetische Prädisposition als auch ein durch medikamentöse Behandlung erworbenes LQTS zu potentiell letalen Arrhythmien. Auch Gendefekte anderer an der Generierung des AP im Herzen beteiligten Kanäle können zu einem LQTS führen (zur Übersicht: Splawski *et al.*, 2000). Die Gesamthäufigkeit aller LQTS in der Bevölkerung ist gering (1: 5000). Da die Folgen dieser Krankheit aber schwerwiegend sind, ist das Interesse an Funktion und Regulation der betreffenden Ionenkanäle im Herzen sehr hoch.

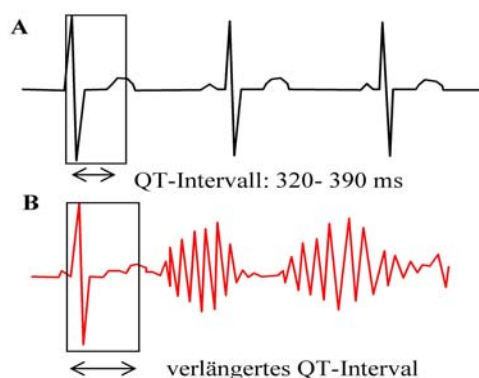


Bild 1.5: Signale eines Oberflächen-EKG im gesunden Herzen und während einer Arrhythmie
(A) QT-Intervall eines gesunden Herzens. (B) Verlängertes QT-Intervall (über 400 ms), das zu einer Arrhythmie führt.

Endogene hERG-Ströme wurden auch in vielen anderen Zellen des menschlichen Körpers gefunden. In den glatten Muskelfasern des gastrointestinalen Traktes (Farrelly *et al.*, 2003) trägt hERG zur Generierung des Ruhepotentials bei. In den Glomus-Zellen des Karotiskörpers fungiert hERG vermutlich als O₂-Sensor. Eine Inhibierung von hERG in diesen Zellen führt zu einer verstärkten Auslösung von AP an den afferenten Nerven, was der beobachteten physiologischen Reaktion auf Hypoxie entspricht (Overholt *et al.*, 2000). In Zellen früher Differenzierungsphasen (Zellen der Neuralleiste) und in Tumorzellen (Neuroblastom- oder GH3/B6-Zellen) wird hERG eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben (zur Übersicht: Schwarz und Bauer, 2004).

1.3.5 Oxidative Modulation von hERG

Eine direkte Oxidation von hERG wurde bisher in verschiedenen Systemen untersucht. Dabei variieren die beobachteten Effekte, je nachdem wie und welche ROS generiert und in welchen Organismen die Kanäle untersucht wurden.

Bei hERG in Neuroblastomzellen führt eine mehrtägige Hypoxie zur Verlangsamung der Deaktivierungskinetik und einer Verschiebung von V_{h_inakt} (Spannung bei der die Hälfte aller Kanäle aus der Inaktivierung zurückkehren) hin zu positiven Potentialen. Dies führt zu einer Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit und könnte den hohen Anteil an hERG-Strom erklären, der oft in Tumorzellen gefunden wird (Fontana *et al.*, 2001). Werden hingegen endogene hERG-Kanäle nur für einige Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, so führt die damit verbundene Zunahme an ROS zur bis zu 50 %-igen Reduktion der Stromamplitude (Nanduri *et al.*, 2008). Ein Anstieg der ROS-Konzentration in der Zelle unter hypoxischen Bedingungen wurde auch von Guzy *et al.* (2006) beschrieben.

Eine externe Applikation von H₂O₂ an hERG in CHOK1-Zellen bewirkt eine Beschleunigung der Aktivierungs- und der Deaktivierungskinetik. Eine frühere und schnellere Aktivierung führt zu einer Zunahme der Auswärtsstromamplitude. Dies könnte

die elektrophysiologische Basis dafür sein, dass H_2O_2 -behandelte ventrikuläre Myozyten eine Amplitudenzunahme während der Plateauphase und eine Abnahme während der Repolarisierungsphase zeigen (Berube *et al.*, 2001). Eine H_2O_2 -induzierte Zunahme der Stromamplitude von hERG wurde für eine heterologe Expression des Kanals in HEK293-Zellen sowie für endogenen hERG in den Zelllinien SK-BR-3, SH-SY5Y und HL-1 gezeigt (Han *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2002).

Wenn als ROS-generierendes System $\text{FeSO}_4/\text{Fe}/\text{Asc}$ verwendet wird, führt dies an hERG in *Xenopus*-Oozyten zu einem Anstieg der Auswärtsströme. Dieser beruht auf einer Verschiebung von V_{h_inakt} hin zu positiveren Potentialen. Eine Applikation von KAT oder NO verhindert diese Eisen-abhängige ROS-Wirkung an hERG. Vermutlich beruht dies auf einer entweder durch KAT oder durch NO induzierten Verringerung des ROS-Gehaltes. Als Interaktionsstelle dieser ROS-Regulation wurden zwei Histidine (His 578, His 579) im S5-S6-Verbindungsstück identifiziert (Pannaccione *et al.*, 2002).

Einige unter pathophysiologischen Bedingungen akkumulierende Substanzen zeigen in ventrikulären Myozyten eine vermindernde Wirkung auf den I_{Kr} -Strom. So führt die mit Diabetes mellitus einhergehende Hyperglykämie zu einer Zunahme an ROS und zu einer Verminderung des I_{Kr} -Stromes. Bei Patienten mit kongestiven Herzfehler (CHF) und diabetischen Kardiomyopathien kommt es zu einem Anstieg der Konzentrationen von Ceramid und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Beide Substanzen führen zu mehr ROS in der Zelle und zur Reduktion des I_{Kr} -Stromes. Sowohl die durch Ceramid, TNF- α und Hyperglykämie bedingte Zunahme an ROS als auch die Verminderung von I_{Kr} kann durch eine Applikation von Vitamin E und MnTBAP (SOD-Mimetikum) verhindert beziehungsweise umgekehrt werden (Bai *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2003, 2006). Auch die über das Xanthin/Xanthin Oxidase-System (X/XO) produzierten Superoxidanionen führen zu einer Reduktion des hERG-Stromes. Diese Reduktion kann ebenfalls durch Vitamin E und MnTBAP aber nicht durch KAT verhindert werden (Wang *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine physiologische Modulation des Kanals durch ROS, speziell durch Superoxidanionen, hin.

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

hERG generiert die Hauptkomponente des repolarisierenden Stromes im kardialen AP. Pathophysiologische Modulationen des Kanals durch ROS tragen deshalb zur Ausbildung von Kardiomyopathien und zur Entstehung von Arrhythmien bei. So kommt es als Begleiterscheinung der Diabetes mellitus bei vielen Patienten zu einer ROS-induzierten Inhibierung von hERG und, als deren Folge, zu einer Verlängerung des QT-Intervalles. Dieses arrhythmische Risiko ließe sich verringern, indem der durch hERG generierte Kaliumauswärtsstrom reaktiviert wird und zur Verkürzung der APD beiträgt. Unter ischämischen Bedingungen, in denen die ATP-Reserven einer Zelle aufgebraucht sind, könnte eine gesteigerte oder reaktivierte Aktivität von hERG die Generierung des

negativen MP unterstützen und einer Hyperkaliämie entgegenwirken. Daher sehen wir hERG als ein potentiell Zielmolekül zur Behandlung von Kardiomyopathien und sind an dem molekularen Verständnis einer Modifikation von hERG durch ROS interessiert. Unser Ziel ist es, den Effekt oxidierender Substanzen an heterolog in HEK293-Zellen exprimierten hERG-Kanälen zu charakterisieren. Als eine Oxidation bezeichnen wir hierbei die kovalente Modifikation des Proteins durch die Substanzen ChloraminT (ChT) und Natrium(2-sulfonatethyl)-methanthiosulfonat (MTSES). Beide Substanzen modifizieren nur schwefelhaltige AS und simulieren auf diese Weise die Wirkung endogener ROS am Kanal. Spezifische AS werden durch die Oxidation modifiziert und führen zu Veränderungen an der Stromamplitude oder dem Schaltverhalten des Kanals. Eine Identifizierung dieser AS bildet die Grundlage für die Entwicklung von hERG-Aktivatoren, deren Wirkungsmechanismus zum Beispiel auf der Maskierung spezifischer ROS-Interaktionsstellen am Kanal beruhen könnte. Die gezielte Eindämmung der Kanalfunktion wäre durch hERG-Inhibitoren möglich, deren Wirkungsmechanismus die negative Modulation des Kanals durch Superoxidanionen nachstellt. Ein solches Medikament könnte, lokal im gastrointestinalen Trakt verabreicht, zu einer Reduktion der invasiven Eigenschaften (Lastraioli *et al.*, 2004) von Darmkrebszellen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie und Zellkultur

2.1.1 Ausgangsplasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardvektoren waren pcDNA3.1 (Invitrogen), p21 (bereitgestellt von Michael Koenen, MPI Heidelberg) und SP64 (bereitgestellt von Mark Keating, Medical School/Children's Hospital Boston). hERG-WT (NM_000238= *erg1*) lag in dem für die Expression in Säugerzellen geeigneten pcDNA3.1-Vektor vor. Als Ausgangsklone standen uns einige Kanalmutanten in den Oozytenvektoren p21 oder pSP64 zur Verfügung, die in den pcDNA3.1 Vektor umgesetzt wurden (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Ausgangsplasmide

Standardvektor	Kanal	Ausgangsklone
pcDNA3.1	hERG	pcDNA3.1: hERG
	hEAG1	pcDNA3.1: hEAG1
	hKv1.5	pcDNA3.1: hKv1.5
pSP64	hERG	pSP64: hERG- F656A
		pSP64: hERG-Y652A
		pSP64: hERG-Δ(2-15)
p21	hEAG1	pSP64: hEAG1- T432S/A443S
	hERG	p21: hERG- dΔC(Δ866-1159)

2.1.2 Herstellung der hERG-Kanalmutanten

Die Substitutionsmutanten wurden größtenteils mit dem *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, CA, USA) erzeugt. Bei dieser Methode erfolgte eine Amplifikation des gesamten Plasmids über zwei Mutagenese-*primer*. Mit einem anschließenden *DpnI*-Verdau wurden die Ausgangsplasmide zerschnitten, so dass nur die neu amplifizierte Plasmide für eine Transformation zur Verfügung standen. Einige der Substitutionen wurden auch über eine *two-step-PCR* (*Pfu*Ultra High-Fidelity DNA Polymerase, Stratagene) eingefügt (diese Arbeit wurde von Nirakar Sahoo durchgeführt). Der amplifizierte Bereich wurde dann über Schnittstellen in den hERG-WT Kanal eingesetzt. Die erhaltenen pcDNA3.1-Klone wurden in *E. coli* transformiert, auf Ampicillin enthaltendem Medium ausplattiert und bei 37 °C kultiviert. Die Präparationen der Plasmid-DNA wurden mit den Mini- beziehungsweise Midi-Plasmid-Aufreinigungs-Reagenzien der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Bei den mit der *QuikChange*-Methode konstruierten Vektoren wurde das gesamte hERG-Gen sequenziert, über einen *Bam*HI/*Hind*III-Verdau ausgeschnitten und in den pcDNA3.1-Originalvektor eingesetzt. Für die mit der *two-step-PCR* hergestellten Konstrukte wurde erst ein Kontrollverdau

durchgeführt und dann nur der amplifizierte Bereich sequenziert. Die verwendeten *primer* für beide PCR-Methoden sind im Anhang aufgeführt (A-1 und A-2). Die Sequenzierungen wurden entweder mit dem LI-COR 4000 von MWG-Biotech (Cyclereader TM Auto DNA Sequencing Kit, Fermentas, Kanada) durchgeführt oder bei der Firma JenaGen (Jena, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die Kombinationsmutanten wurden, wenn möglich, durch Verdau und Ligation aus den schon bestehenden Kanalmutanten generiert. Wenn keine passenden Schnittstellen vorhanden waren, wurden die Mutationen über die *QuikChange*-Methode eingefügt.

2.1.3 Zellkultur

HEK293-Zellen (CAMP, Porton Down, Salisbury, UK) wurden in 50 ml-Kulturflaschen, befüllt mit 25 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), 1:1 versetzt mit Hams F12 und 1:10 versetzt mit FKS (fetales Kälberserum), bei 37 °C und 5 % CO₂-Gasgehalt kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 2 bis 4 Tage, wenn 70 bis 80 % Konfluenz der Zellschicht erreicht waren. Dazu wurden die Zellen erst mit PBS-Puffer gewaschen und dann durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) abgelöst. Diese Reaktion wurde mit 8 ml Medium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Von dieser Zellsuspension wurden 1.5 ml und 0.5 ml in je eine neue Kulturflasche überführt. Die Kultivierung in verschiedenen Dichten ermöglichte eine fast tägliche Ausplattierung von Zellen für die elektrophysiologischen Messungen.

2.1.4 Transfektion

Die Zellen wurden in zwei unterschiedlichen Dichten in 35-mm Petrischalen, welche zuvor mit Gelatine (2 %-ige Lösung) beschichtet wurden, ausplattiert. Nach 8 bis 24 h wurden Dichte und Form der angewachsenen Zellen mit dem Mikroskop überprüft. Wenn die Zellen gut differenziert waren und circa 10 bis 30 % der Oberfläche bedeckten, wurden die Petrischalen für 3 h mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Dieser bestand pro Petrischale aus 100 ml FKS-freiem Medium, 2 µg DNA und 2 µl Superfect-Transfektionsreagenz (QIAGEN, Deutschland). Zur visuellen Identifikation der transfizierten Zellen dienten CD8-Antikörper gekoppelte magnetische *beads* (Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Deutschland), die jeweils direkt vor der Messung auf die Petrischale gegeben wurden. Daher war es notwendig, dass zu der jeweiligen Kanal-DNA auch der CD8-Rezeptor in einem Verhältnis von 1:4 kotransfiziert wurde. Wenn geringe Transfektionsraten auftraten, wurde der Transfektionsansatz über Nacht auf den Zellen belassen. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten innerhalb von 1 bis 3 Tagen nach Transfektion.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Patch-clamp-Messungen: whole-cell-Konfiguration

Mit der *patch-clamp*-Technik kann der durch Kanäle generierte Ionenstrom einer Zellmembran gemessen werden (Neher und Sakmann, 1976). Dabei wird durch eine negative Rückkopplung im Verstärker (Bild 2.1) ein Kompensationsstrom erzeugt, der das Membranpotential auf einer Sollspannung hält. Das Verhalten dieses Kompensationsstromes entspricht dem Schaltverhalten der transfizierten Kanäle. In dieser Arbeit wurde ein EPC9-Verstärker von HEKA Elektronik (Deutschland) verwendet und bei variablen Spannungen der Strom über die Membran gemessen.

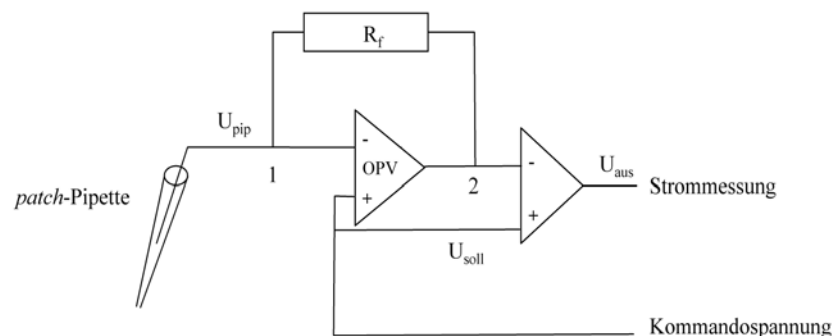


Bild 2.1: Vereinfachtes Schaltbild eines *patch-clamp*-Verstärkers

Dieser Schaltkreis (nach Numberger und Draguhn, 1996) ist im Vorverstärker untergebracht und stellt einen Strom-Spannungswandler dar. Weicht die Kommandospannung (U_{soll}) von der Pipettenspannung ab (U_{pip}), entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers (OPV) eine Spannung, welche proportional zu dieser Differenz, aber sehr viel größer ist. Dieser Spannungsunterschied zwischen Punkt 1 und Punkt 2 lässt durch den Rückkopplungswiderstand (R_f) den Strom $I_f = U_f / R_f$ fließen. Dieser Strom fließt in die Pipette und erzeugt die gewünschte Membranspannung. Dieser Ausgleich erfolgt sehr schnell, so dass das Pipettenpotential jederzeit gleich dem Kommandopotential ist. Die Spannung an Punkt 2 wird mit U_{soll} verglichen (über einen zweiten Differenzverstärker) und die Differenz U_{aus} in Strom umgerechnet.

Mit Hilfe einer Glaspipette (*patch-Pipette*) wurde ein sehr kleiner Abschnitt der Zellmembran von seiner Umgebung isoliert. Die *patch-Pipette* enthielt eine Elektrode, die von einer definierten Lösung umgeben und an dem Vorverstärker der Messeinrichtung befestigt war. Das Anlegen eines leichten Überdruckes schützte die Pipette vor Verunreinigungen. Die Zellen befanden sich in der Messlösung in einer kleinen Petrischale auf dem Mikroskopisch. In diese Petrischale tauchte die Badelektrode ein, so dass sich bei Kontakt der Pipette mit der Messlösung der Stromkreis schloss. Daraufhin wurde der Pipettenwiderstand bestimmt und das Offset-Potential kompensiert. Durch vorsichtiges Annähern der Pipette an eine Zelle und gegebenenfalls leichtes Saugen wurde eine mechanische Verbindung mit sehr hohem Widerstand (*gigaseal*) zwischen Zellmembran und Pipette hergestellt. Von dieser *cell-attached*-Konfiguration aus wurde nun durch Unterdruck das unter der Pipette liegende Membranstück zerrissen, um in die *whole-cell*-Konfiguration zu gelangen (Hamill *et al.*, 1981). Alle Experimente dieser Arbeit wurden in der

whole-cell-Konfiguration und bei 22 °C durchgeführt (Temperatur Controller SN941002, Lorenz, Lindau, Deutschland). Der Widerstand des *gigaseals* in der *cell-attached*-Konfiguration betrug immer mindestens 1 GΩ. Bei jeder Messung erfolgte eine Kompensation des Serienwiderstandes für 65 bis 80 %. Je größer der Serienwiderstand ist, desto eher können Stromantworten mit kleinen Zeitkonstanten nicht mehr aufgelöst werden (Sigworth, 1995). Die Messungen in dieser Arbeit wurden mit Serienwiderständen von maximal 1.8 GΩ durchgeführt. Stieg der Serienwiderstand einer Zelle während der Messung an, wurde versucht, diesen durch das Anlegen eines leichten Unterdruckes zu verringern.

Jede Potentialänderung führt zu einem Strom, der nicht durch spannungsabhängige Kanäle erzeugt wird, sondern durch den ohmschen Widerstand der Zellmembran selbst. Dieser spannungsunabhängige Leckstrom wurde direkt während der Messung von den spannungsaktivierten Strömen nach der p/4-Methode subtrahiert. Es wurde dazu ein Protokoll mit jeweils vier Spannungspulsen durchgeführt, die nur ¼ der Amplitude des entsprechenden Testpulses hatten. Durch Mittelwertbildung und Multiplikation mit vier wurde für den jeweiligen Testpuls der Stromanteil ermittelt, der durch die spannungsunabhängigen Ströme vermittelt wird.

Der Verstärker produzierte analoge Daten die in Anpassung an die Amplitude und Frequenz der Ströme gefiltert, digitalisiert und an den Rechner geleitet wurden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit IgorPRO (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) und Microsoft Excel. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student'schen t-Tests als 2-seitiger t-Test zweier Stichproben mit unterschiedlicher Varianz. In dieser Arbeit wurde durchgängig ein Dezimalpunkt verwendet.

2.2.1.1 *Patch*-Pipetten, Lösungen und Chemikalien

Die *patch*-Pipetten aus 1.5 mm Kimax-Glas (Kimble Glass, USA) wurden mit einem Mikropipetten-Puller Modell P-97 (Sutter Instrument Company, USA) gezogen, danach durch Erhitzen poliert und mit Intrazellulärlösung befüllt. Es wurden nur Pipetten mit einem Zugangswiderstand von 0.7 bis 2.0 MΩ verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurde für alle Messungen als Badlösung (mM): 110 NaCl, 40 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.4 mit NaOH) und als Pipettenlösung (mM): 130 KCl, 2.56 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4 mit KOH) verwendet.

Bei Messungen mit Chloramin T (ChT) wurde die Badelektrode über eine Agarbrücke mit der Badlösung verbunden. Zur Herstellung der Agarbrücke wurde eine 2 %ige-Agarose/KCl-Lösung in der Mikrowelle erhitzt und in eine U-förmig gebogene Glaskapillare gefüllt. Das ChT (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) wurde täglich aliquotiert und erst vor Beginn jeder Messung mit der Badlösung versetzt, so dass eine 10 mM ChT-Stammlösung entstand. Aus dieser Stammlösung wurde, sofern nicht anders angegeben, eine 300 µM ChT-Lösung hergestellt. Davon wurden mit einer Pasteur-Pipette circa

2 ml an einem Rand des Schälchens appliziert und am anderen Rand wieder abgesaugt. Dieser Wechsel fand 4 bis 5 mal hintereinander statt, so dass immer circa 10 ml ChT-Lösung über die Zellen gespült wurden. Die Herstellung und externe Applikation von DTT-Lösungen erfolgte analog. Die verwendeten MTS-Substanzen (Toronto Research Chemicals, ON, Kanada) wurden alle am selben Tag abgewogen, mit A. bidest. gelöst und als 100 mM Aliquot bei -22 °C gelagert. Zu Beginn der Messungen wurden diese Aliquote aufgetaut und mit Pipettenlösung versetzt, so dass 0.5 mM beziehungsweise 1 mM MTS-Lösungen entstanden. Die MTS-Stammlösungen wurden bis zu 3 h auf Eis gelagert.

2.2.2 Messprotokolle und Datenanalyse

hERG-Kanäle sind in Abhängigkeit vom Membranpotential entweder offen, geschlossen oder inaktiviert. Bei Depolarisation der Membran öffnen die Kanäle und gehen sehr schnell in den inaktiven Zustand über. Negative Spannungen führen zu einem langsamen Schließen der Kanäle. Generell wurde für alle hERG-Messungen, wenn nicht anders angegeben, ein Haltepotential (HP) von -60 mV gewählt. Zellen, deren maximale Stromamplitude größer als 20 nA oder kleiner als 0.5 nA war, wurden nicht verwendet.

2.2.2.1 Aktivierungsparameter von hERG

Die halbmaximale Aktivierungsspannung wurde ermittelt, indem die Zellen schrittweise auf Potentiale zwischen -75 und 45 mV gebracht wurden (Bild 2.2 A). Bei einer anschließenden Repolarisierung auf -120 mV generierten offene Kanäle einen Einwärtsstrom, dessen Amplitude gegen die jeweilige Spannung aufgetragen wurde (Bild 2.2 B, C). Der Übergang von geschlossenen zu offenen Kanälen ist mit Konformationsänderungen des Kanalproteins und dem Transport von *gating*-Ladungen einer bestimmten Valenz durch die Membran verbunden. Ausgehend davon, dass nur zwei Zustände für die geladenen Partikel möglich sind, kann man die Wahrscheinlichkeit des geöffneten Zustandes als Funktion der Membranspannung angeben und mit der Boltzmann-Gleichung das Gleichgewichtsverhältnis von offenen zu geschlossenen Kanälen beschreiben (Hille, 2002, Aidley und Stansfield, 1996).

$$I(V) = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + \exp(-(V - V_h)/k_h)) \quad (1)$$

$$k_h = kT/q$$

Hierbei entspricht I_{\min} dem minimalen und I_{\max} dem maximalen Amplitudenwert. V_h beschreibt in diesem Fall die Spannung bei der die Hälfte aller Kanäle aktiviert ist (V_{h_akt}). Die Variable k_h beschreibt die Spannung, die notwendig ist, um eine e-fache Zunahme der Leitfähigkeit zu erreichen und wird auch als Steigungsfaktor bezeichnet (k_{h_akt}). Je größer der Wert für k_h ist, desto flacher ist der Kurvenverlauf. Dabei ist k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und q die effektiv transportierte Ladung.

Der Zeitverlauf der Aktivierung von hERG wurde aufgrund der schnellen Inaktivierung des Kanals mit einem *envelope of tail*-Protokoll nach Trudeau *et al.*, 1995 ermittelt. Dabei wurden Einwärtsströme, die auf eine Folge von Pulsen mit steigender Depolarisierungsdauer entstanden, gemessen und deren Amplitudenwerte gegen die Zeit aufgetragen (Bild 2.2 D, E). Zwischen 20 ms und 1280 ms ergab sich ein mit einer monoexponentiellen Funktion beschreibbarer Kurvenverlauf (Bild 2.2 F).

$$I(t) = \text{Amp}_0 + \text{Amp}_1 \cdot (1 - \exp(-(t - t_0)/\tau)) \quad (2)$$

Hierbei entspricht Amp_0 dem Startamplitudenwert in Ampere, Amp_1 dem relativen Verhältnis der beiden Stromamplituden und τ der Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{akt}) in ms.

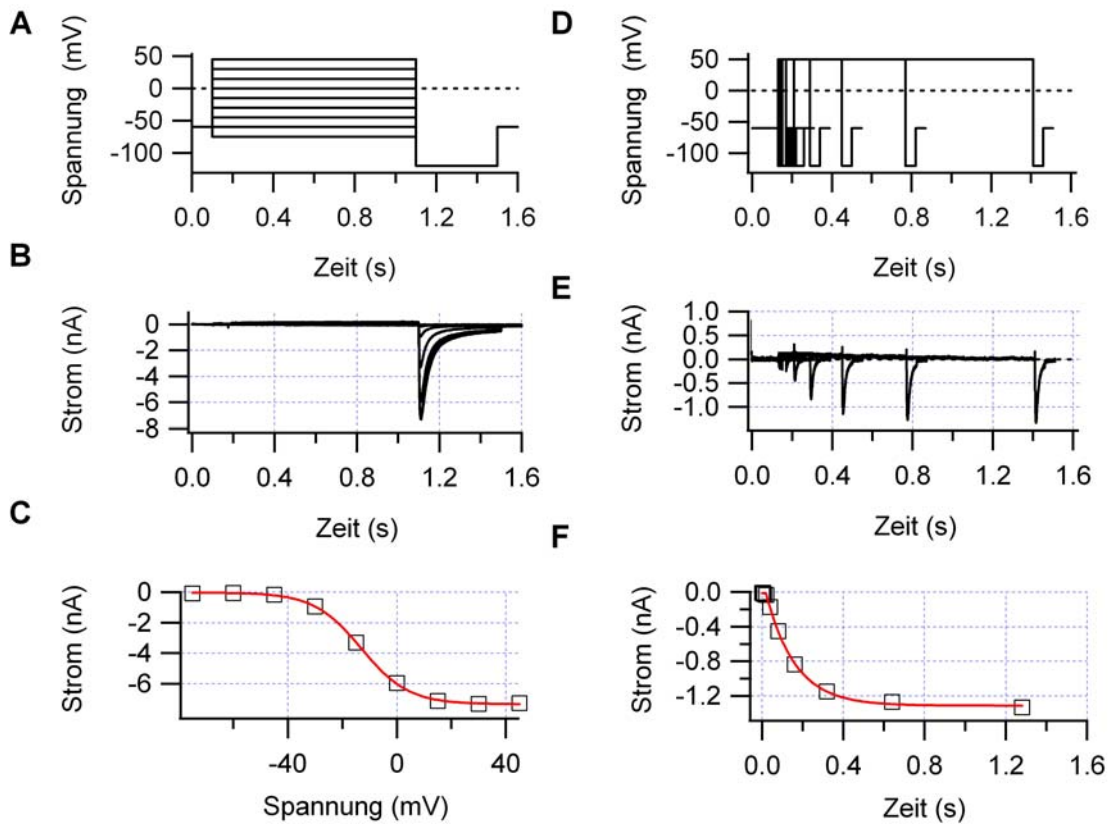


Bild 2.2: Ermittlung der Aktivierungsparameter von hERG

(A) Pulsprotokoll zur Ermittlung von $V_{h_{\text{akt}}}$ und des Steigungsfaktors $k_{h_{\text{akt}}}$. (B) Repräsentative Stromspuren für eine Zelle. (C) Graphische Darstellung der entsprechenden Strom-Spannungskorrelation, Anpassung der Datenpunkte mit der Boltzmann-Gleichung (rote Linie). (D) Mit dem *envelope of tail*-Protokoll wurden depolarisierende Pulse (+45 mV) für ansteigende Zeitintervalle von 0/ 5/ 10/ 20/ 40/ 80/ 160/ 320/ 640 und 1280 ms Dauer generiert. (E) Repräsentative Stromspuren für eine Zelle. (F) Darstellung des Strom-Zeit-Kurvenverlaufes, monoexponentielle Anpassung der Datenpunkte (rote Linie).

2.2.2.2 Deaktivierungs- und Inaktivierungsparameter von hERG

Zur Charakterisierung aller in dieser Arbeit verwendeten hERG-Mutanten wurde ein Protokoll verwendet, mit dem sowohl die Spannungsabhängigkeiten als auch der zeitliche Verlauf der Deaktivierung und Inaktivierung bestimmt werden konnte (Bild 2.3 A). Mit diesem Protokoll wurden in den ersten 100 ms alle Kanäle geöffnet und inaktiviert. Dann wurden für 10 ms verschiedene Spannungen zwischen -145 mV und 55 mV angelegt, um die spannungsabhängige Rückkehr von der Inaktivierung verfolgen zu können. Bei einer daran anschließenden Depolarisation auf 55 mV wurden Auswärtsströme generiert. Deren Amplitudenwerte wurden (vergrößert in Bild 2.3 C) gegen die Spannungen aufgetragen und eine Anpassung der Datenpunkte mit der Boltzmann-Gleichung (Bild 2.3 D) vorgenommen. V_h entsprach dabei der Spannung, bei der die Hälfte aller Kanäle aus dem inaktivierten Zustand zurückkehrten (V_{h_inakt}) und k_h dem Steigungsfaktor (k_{h_inakt}).

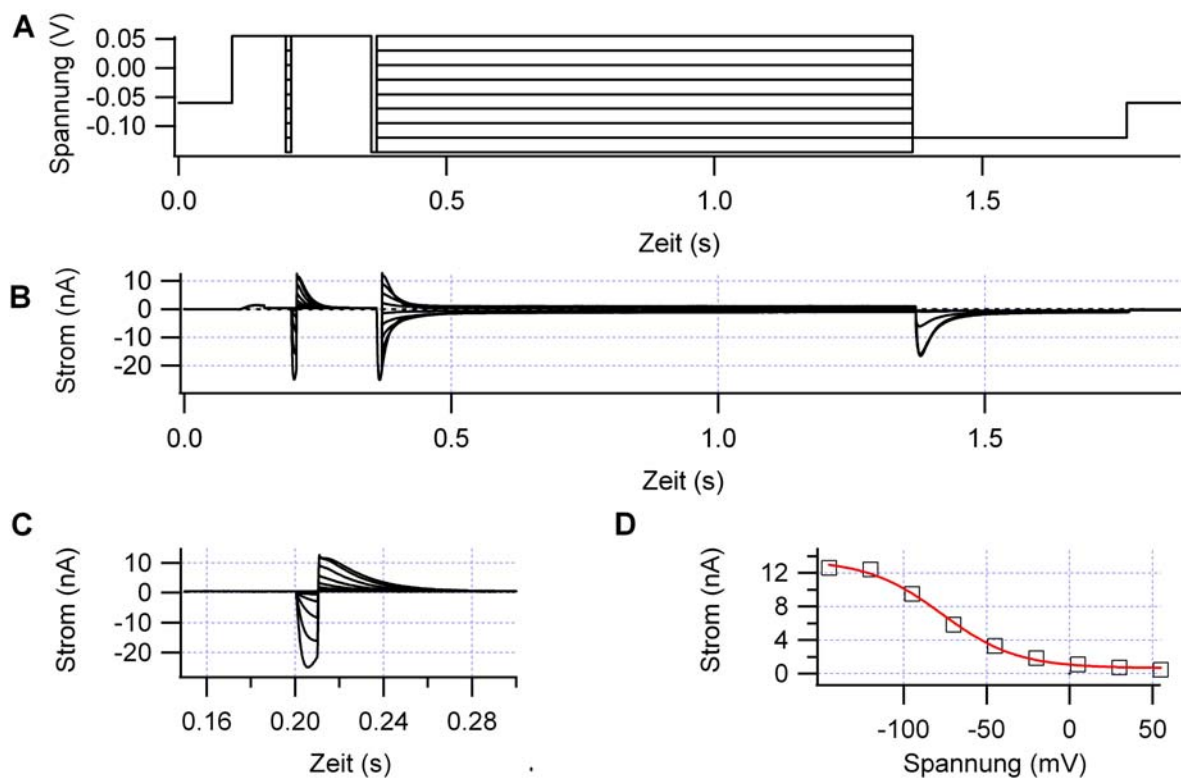


Bild 2.3: Pulsprotokoll für die Ermittlung der spannungsabhängigen Rückkehr aus der Inaktivierung

(A) Protokoll für Inaktivierungs- und Deaktivierungsparameter von hERG. (B) Mit diesem Protokoll erzeugte hERG-Stromspuren. (C) Vergrößerte Darstellung der Auswärtsströme. (D) Strom-Spannungs-Kennlinie für die Rückkehr aus dem inaktivierten Zustand. Die Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit der Boltzmann-Gleichung (rote Linie).

Im weiteren Verlauf des Protokolls wurden nach 200 ms Depolarisation die Zellen für 10 ms auf -145 mV repolarisiert und dann auf Spannungen zwischen -145 mV und 55 mV gesetzt. Bei den Spannungen, die negativer als das Umkehrpotential waren, wurden Ein-

wärtsströme generiert, deren Abflachung dem Zeitverlauf der Deaktivierung entsprach. Die Stromspuren für -145 mV, -120 mV und -95 mV wurden innerhalb des Zeitintervalls von 370-600 ms mit der Gleichung (2) beschrieben (Bild 2.4 B, schwarze Linie für -145 mV), wobei τ der Zeitkonstante der jeweiligen Spannung entsprach (zum Beispiel: $\tau_{\text{deakt -145 mV}}$). Wurde nach den 10 ms Repolarisation auf positivere Spannungen gepulst, entstanden Auswärtsamplituden, deren Zeitverlauf der schnellen Inaktivierung der Kanäle entsprach. Die Stromspuren der Spannungen 55 mV, 30 mV und 5 mV wurden innerhalb des Zeitintervalls von 380-600 ms mit der Gleichung (2) angepasst (Bild 2.4 D, schwarze Linie für 55 mV).

Aufgrund der Auswertung von jeweils drei Spannungen wurde für die Inaktivierung und die Deaktivierung eine Aussage über deren Spannungsabhängigkeit möglich. Einige Kanalmutanten zeigten eine beschleunigte Rückkehr aus der Inaktivierung. In diesen Fällen wurden die Repolarisierungsintervalle von 10 ms auf 5 ms reduziert und die entsprechenden Daten mit einer hochgestellten 1 markiert. Um die Inaktivierungsparameter der Mutante M645L zu beschreiben, war eine stärkere Repolarisation (auf -170 mV) notwendig. Die entsprechenden Daten wurden mit einer hochgestellten 2 gekennzeichnet (A-7). Zur Ermittlung der Schalteigenschaften wurden eine bestimmte Anzahl Zellen (N) gemessen, von diesen die jeweiligen Parameter gemittelt und mit dem *standard error of mean* (SEM) angegeben.

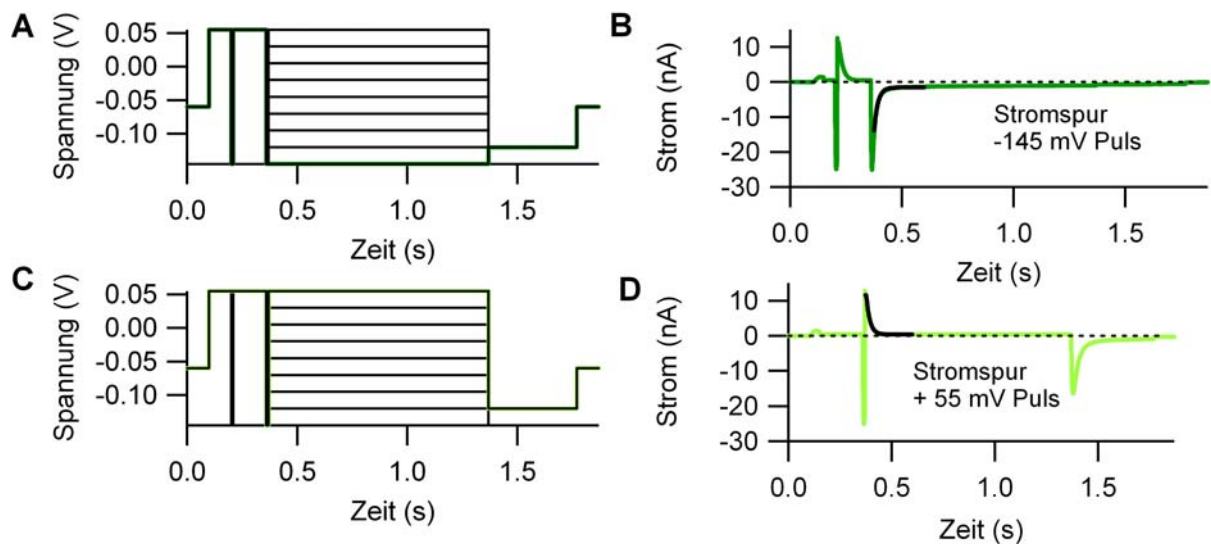


Bild 2.4: Pulsprotokolle mit Beispielen für den Verlauf der Stromspuren bei -145 mV und 55 mV

(A) Pulsprotokoll aus Bild 2.3 A mit dunkelgrün markiertem -145 mV Puls. (B) Mit diesem Protokoll erzeugte Stromspur bei der die monoexponentielle Anpassung des Zeitverlaufes der Deaktivierung als schwarze Linie eingezeichnet ist. (C) Pulsprotokoll mit hellgrün markiertem +55 mV Puls. (D) Mit dem Protokoll aus A erzeugte Stromspur, bei der die monoexponentielle Anpassung des Zeitverlaufes der Inaktivierung als schwarze Linie eingezeichnet ist.

2.2.2.3 Effekt verschiedener Substanzen auf hERG

Die Wirkung bestimmter Substanzen auf die Amplitude von hERG wurde mit dem in Bild 2.5 A dargestellten Pulsprotokoll untersucht. Dabei wurden die Kanäle auf +50 mV depolarisiert und der bei der anschließenden Repolarisation auf -120 mV auftretende maximale Einwärtsstrom gegen die Zeit aufgetragen. Das Wiederholungsintervall betrug 10 s. Bild 2.5 B zeigt die Strom-Zeit-Beziehung einer mit ChT behandelten Zelle. Die externe Applikation von ChT wurde schrittweise durch den Austausch des Mediums mit einer Pasteur-Pipette vorgenommen. Vor der Applikation erfolgte eine Kontrollspülung mit externem Medium, um eine Veränderung der Stromamplitude durch den Spülvorgang auszuschließen. Mit der Applikation von ChT wurde erst bei stabilen Amplitudenwerten begonnen. Das ChT verblieb dann bis zum Ende der Messung auf den Zellen (Bild 2.5 B, grüner Balken). Um den Effekt von ChT auf hERG innerhalb der ersten 200 s zu charakterisieren, wurde der Parameter I_{200} eingeführt. Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis $I(200 \text{ s nach Substanz})/I_k$ (vor Substanz) und entspricht dem prozentualen Anteil des verbleibenden Stromes dividiert durch 100. Für ChT-Messungen wurde als zusätzlicher Parameter die Zeitkonstante τ_{ChT} gewählt, da es möglich war, den Zeitverlauf der Amplitudenabschwächung mit Gleichung (2) zu beschreiben (Bild 2.5 B, schwarze Linie).

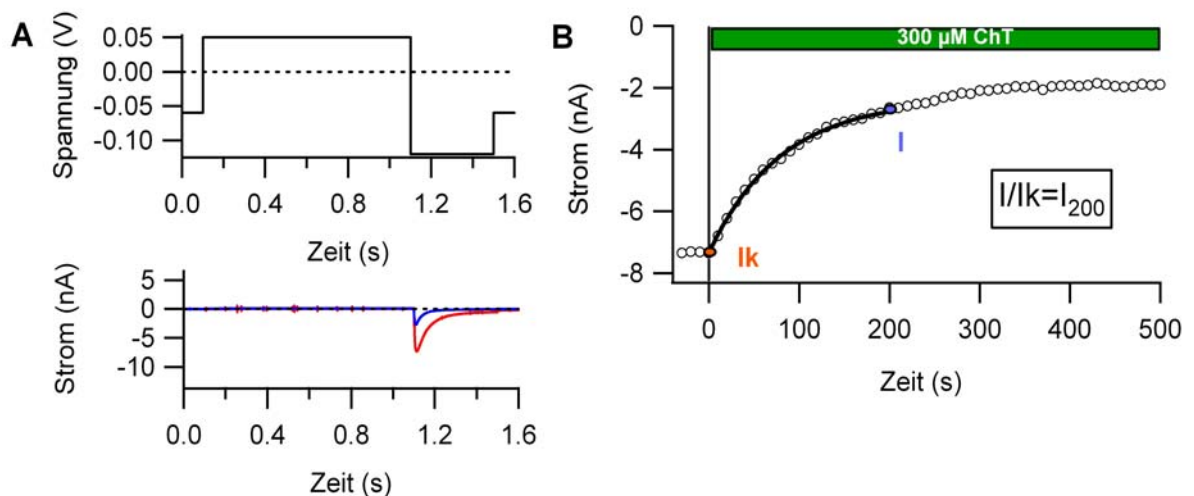


Bild 2.5: Ermittlung, graphische Darstellung und Analyse der ChT-induzierten Amplitudenreduktion

(A) hERG-Stromspuren erzeugt mit dem dargestellten Pulsprotokoll vor (rot) und 200 s nach (blau) der ChT-Applikation. (B) Strom-Zeit-Beziehung einer Zelle vor und nach ChT-Applikation. Während der ersten Pulse wurde die Zelle mit externem Medium gespült. Nach dem vierten Puls wurden 300 μM ChT appliziert und verblieben auf den Zellen (grüner Balken). I_k ist rot und I blau gekennzeichnet und der monoexponentielle Verlauf der Stromreduktion innerhalb der 200 s als schwarze Kurve dargestellt.

Eine interne Applikation von DTT oder MTS-Substanzen erfolgte über die *patch*-Pipette, wobei die Substanzen direkt vor der Messung von einer 100 mM Stammlösung aus verdünnt wurden. Für MTS-Messungen wurde der Zeitverlauf der Amplitudenabschwächung nicht ausgewertet, da die Diffusion der MTS-Substanzen zu stark mit der Zellgröße, dem Zugangswiderstand und der Pipettenform variierte und sich dies in sehr unterschiedlichen Kurvenverläufen widerspiegelte. Daher erfolgte für die Stromreduktion durch MTSES keine Bestimmung der Zeitkonstante, sondern es wurde nur das Verhältnis I/I_k nach 200 s gebildet (I_{200}).

Für eine Charakterisierung des ChT- beziehungsweise MTS-Effektes wurden immer 4 bis 9 Zellen vermessen. Zur graphischen Darstellung wurden die Amplitudenwerte dieser Zellen auf den letzten Wert vor ChT-Applikation beziehungsweise auf den letzten Wert vor Eintreten der MTS-Amplitudenreduktion normiert. Diese normierten Amplitudenwerte wurden gemittelt und als relativer Strom \pm SEM (rel. Strom \pm SEM) gegen die Zeit aufgetragen (wie in Bild 3.2 D). Die graphische Darstellung der MTS-Experimente erfolgte analog. Die Parameter $I_{200} \pm$ SEM und $\tau_{\text{ChT}} \pm$ SEM wurden zum Vergleich des ChT-Effektes verschiedener Kanäle beziehungsweise Kanalmutanten angegeben. Zur Auswertung der MTS-Experimente wurde nur der Parameter I_{200} verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Modifikation von Kaliumkanälen durch ChT

In nativen Geweben wurden verschiedene ROS-bedingte Modifikationen an Proteinen gefunden, wie beispielsweise die Ausbildung von Carbonylresten oder Methioninsulfoxiden (Met-O). Diese Modifikationen können entweder direkt oder indirekt durch HOCl, Peroxynitrite, Hydroxylradikale oder Singulett-Sauerstoff generiert werden (Balasubramanian *et al.*, 1990, Shacter, 2000). Als stabile Generatoren von Singulett-Sauerstoff gelten Chloramine (Stief *et al.*, 2003). Chloramin T (ChT) wird als mildes Oxidationsmittel beschrieben, das bei physiologischen pH-Werten nur Cysteine (Cys) und Methionine (Met) modifiziert (Shechter *et al.*, 1975). Zudem ist bekannt, dass ChT die Schalteigenschaften und Leitfähigkeiten der Kaliumkanäle Kv1.4, hSlo und ShC/B modifiziert (zur Übersicht: Kourie, 1998). Zusammen mit unseren Kooperationspartnern Su *et al.* (2007) haben wir gezeigt, dass eine externe Applikation von 300 μ M ChT zu einer starken Reduktion der Stromamplitude von hERG führt (Bild 3.1). Bei einer gleichzeitigen internen Applikation von bMSRA (MSRA vom Rind, 15 μ g/ml) und DTT (4 mM) fiel die Reduktion des Stromes deutlich geringer aus.

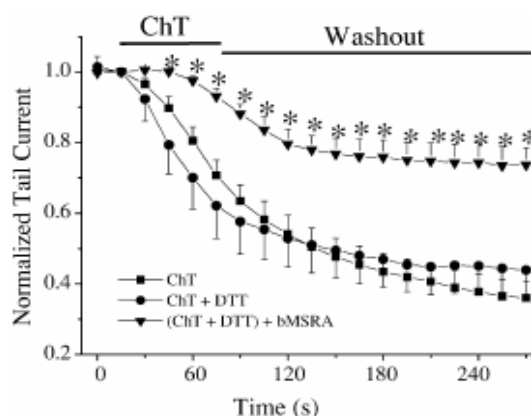


Bild 3.1: ChT-induzierte Stromreduktion an hERG bei gleichzeitiger DTT beziehungsweise bMSRA und DTT Applikation (aus Su *et al.*, 2007)

Die Messungen wurden in HEK293-Zellen bei 37 °C durchgeführt. Von -80 mV aus wurde für 3 s auf 0 mV depolarisiert und danach auf -50 mV repolarisiert. Die Auswärtsströme von je 5 bis 10 Zellen wurden auf den Anfangsstrom zum Zeitpunkt 0 normiert, gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Applikation von 300 μ M ChT erfolgte 60 s lang. Danach wurden die Zellen für 240 s mit externem Medium gespült. Amplitude-Zeit-Beziehungen für die Messungen mit der normalen internen Lösung (gefülltes Quadrat), Messungen mit 4 mM DTT intern (gefüllter Kreis) und Messungen mit 4 mM DTT und 15 μ g/ μ l bMSRA intern (gefülltes Dreieck). (*P<0.05)

Da sich diese ChT-induzierte Stromreduktion durch eine Applikation von bMSRA abschwächen lies, wurde vermutet, dass der beobachtete Stromverlust auf einer Oxidation von Met zu Met-O beruht und diese möglicherweise reversibel ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation des hERG-Kanals durch Oxidation und Reduktion spezifischer Met zu untersuchen. Dabei sollten die molekularen Grundlagen der

ChT-induzierten Stromreduktion identifiziert werden. Die ersten Experimente sollten zeigen, ob ChT spezifisch wirkt oder über die Modifikation anderer Zellkomponenten zu einer generellen Reduktion von Kaliumströmen führt. Dafür haben wir die Wirkung von 300 μM ChT auf hKv1.5, einen Kaliumkanal mit einer geringeren Anzahl der leicht zu oxidierenden Met und Cys, untersucht. Im Vergleich dazu wurde der hEAG1-Kanal mit einer, annähernd dem hERG-Kanal entsprechenden Anzahl dieser AS untersucht (Bild 3.2).

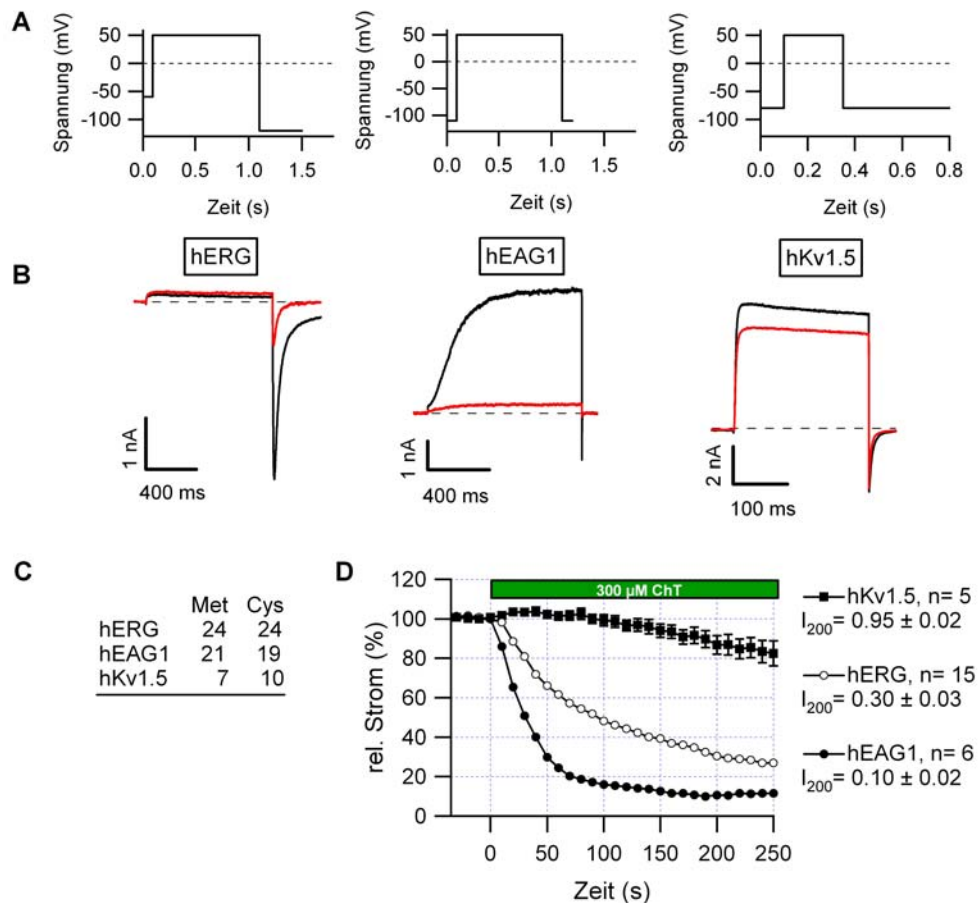


Bild 3.2: Die Wirkung von 300 μM ChT auf drei verschiedene Kaliumkanäle

(A) Die Depolarisation der Membran erfolgte auf +50 mV für 1 s von einem HP von -60 mV aus (für 200 s von einem HP von -80 mV für hKv1.5) im Intervall von 10 s. (B) Repräsentative Stromspuren von hERG, hEAG1 und hKv1.5, jeweils vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) Applikation von 300 μM ChT. (C) Gesamtanzahl der Met und Cys in hERG, hEAG1 und hKv1.5. (D) Die Auswärtsströme von hEAG1 und hKv1.5, aufgenommen am Ende der depolarisierenden Pulse, und der maximale Einwärtsstrom von hERG, aufgenommen am Beginn der Repolarisierung, wurden gegen die Zeit aufgetragen. hKv1.5-Kanäle sind weniger, hEAG1-Kanäle ($\tau_{\text{ChT}} = 29.8 \pm 1.6$ s) stärker sensitiv gegenüber ChT verglichen mit hERG-WT ($\tau_{\text{ChT}} = 76.3 \pm 5.9$ s).

Dabei zeigte sich, dass der hKv1.5-Kanal, welcher im kardialen Atrium zur Repolarisation des AP beiträgt (Bertaso *et al.*, 2002), viel weniger Stromverlust aufwies als die beiden Kanäle der EAG-Familie. Dies deutete darauf hin, dass ChT eine spezifische Reaktion am jeweiligen Kanal hervorruft und dass entweder besonders viele oder speziell exponierte Met und Cys die Kanäle der EAG-Familie sensitiver machen.

Die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y enthält endogene hERG-Kanäle. Aufgrund seiner Eigenschaften als Einwärts-Gleichrichter ist hERG in SH-SY5Y-Zellen elektrophysiologisch gut von anderen endogenen Kaliumströmen zu trennen. Wurden SH-SY5Y-Zellen mit 300 μM ChT behandelt, führte dies zur Reduktion der hERG-Amplitude (Bild 3.3). Diese Stromreduktion war ähnlich stark ($I_{200} = 0.25 \pm 0.05$) wie in transfizierten HEK293-Zellen ($I_{200} = 0.30 \pm 0.02$). Demnach ist die ChT-induzierte Modifikation von hERG in verschiedenen Expressionssystemen zu beobachten.

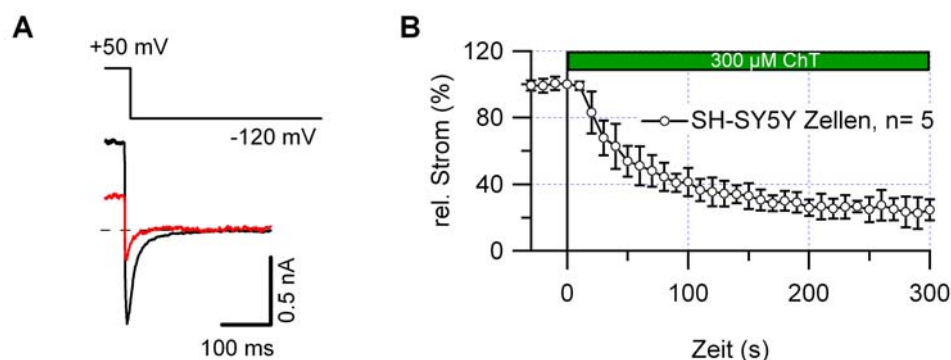


Bild 3.3: ChT-induzierte Stromreduktion an hERG-Strömen in Neuroblastomzellen

(A) Die Depolarisierung der Membran auf +50 mV mit anschließender Repolarisierung auf -120 mV generiert einen Einwärtsstrom der langsam deaktiviert. Dieser Einwärtsstrom entspricht dem Anteil an hERG in einer SH-SY5Y-Zelle vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) ChT-Applikation. (B) Amplitude-Zeit-Beziehung von hERG-Strömen in SH-SY5Y-Zellen bei ChT-Applikation.

3.2 Charakterisierung des ChT-Effektes an hERG

3.2.1 Variabilität des ChT-Effektes

Die Fähigkeit der Zelle, pathologische Oxidationen ihrer Proteine abzuwehren, ist abhängig von ihrem Redoxstatus (Shacter, 2000). Dieser kann variieren in Abhängigkeit davon, wie oft eine Zelllinie schon aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Im Verlauf dieser Arbeit wurden 6 verschiedene Aliquote der Zelllinie HEK293 aufgetaut, nacheinander in Kultur genommen und von Passage 6 bis 20 für die elektrophysiologischen Messungen verwendet. Diese unterschiedlichen Aliquote wurden als Zellreihe (ZR) 1 bis 6 nummeriert. Für jede ZR wurde das Schaltverhalten und die ChT-Empfindlichkeit des hERG-WT ermittelt. Dabei variierte der verbleibende Strom nach einer Behandlung mit 300 μM ChT zwischen $I_{200} = 0.22 \pm 0.04$ für ZR 3 und $I_{200} = 0.30 \pm 0.02$ für ZR 1 (Bild 3.4). Um einen möglichen Einfluss der verwendeten ZR oder der Passagenanzahl auf die Messungen zu minimieren, wurden nur Daten derselben ZR miteinander verglichen, die innerhalb von zwei bis drei Wochen erhoben wurden. Die Parameter der Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung des hERG-WT in allen 6 ZR wurden gemittelt und im weiteren Verlauf dieser Arbeit als die WT-Schalteigenschaften bezeichnet (siehe Anhang).

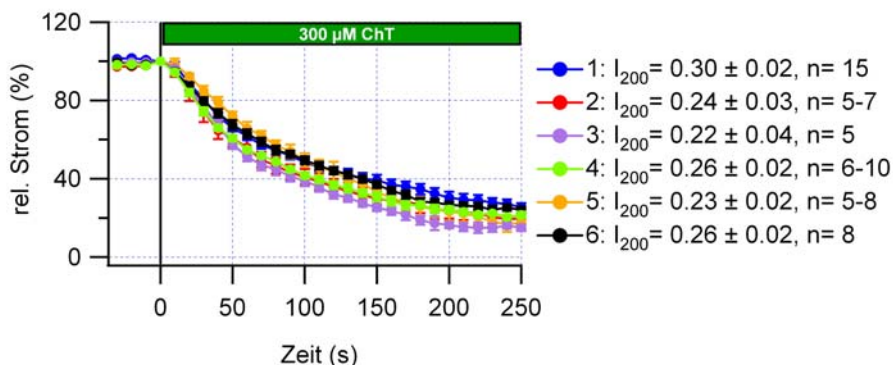


Bild 3.4: Variabilität der ChT-induzierten Stromreduktion des WT in den Zellreihen 1 bis 6

Der Grad der Stromreduktion durch ChT aller in dieser Arbeit verwendeten WT-Kontrollen umfasste I_{200} -Werte von 0.22 bis 0.30. Diese Abweichungen der I_{200} -Werte aller ZR untereinander war mit $P > 0.05$ nicht signifikant.

3.2.2 Stromreduktion in Abhängigkeit von der ChT-Konzentration

Direkt vor Beginn jeder Messung wurde eine 10 mM ChT-Stammlösung angesetzt und auf 30 μ M, 300 μ M beziehungsweise 600 μ M verdünnt. Der ChT-Effekt auf die Amplitude von hERG ist konzentrationsabhängig, da mit 30 μ M ChT ($I_{200} = 0.74 \pm 0.02$, $n = 5$) eine wesentlich geringere Stromreduktion einsetzte als mit 300 μ M ($I_{200} = 0.24 \pm 0.02$, $n = 5$) und 600 μ M ChT ($I_{200} = 0.17 \pm 0.03$, $n = 5$).

3.2.3 Stromreduktion in Abhängigkeit von der Kanalkonformation

Beim Öffnen, Schließen oder Inaktivieren ändert sich die Konformation der Kanäle, wobei bestimmte AS für modifizierende Substanzen leichter zugänglich sind, als sie es im Ruhezustand wären.

Die ChT-induzierte Stromreduktion an hERG wurde bei einem sehr negativen HP (alle Kanäle deaktiviert) und einem möglichst positiven HP (viele Kanäle aktiviert beziehungsweise inaktiviert) ermittelt (Bild 3.5 A). Das I/IK-Verhältnis für diese Messungen wurde schon nach 150 s bestimmt, da ein sehr negatives HP und eine Behandlung mit ChT zu einem verstärkten Verlust des *seals* führte. Die ChT-induzierte Stromreduktion von hERG war bei einem HP von -120 mV stärker ($I_{150} = 0.32 \pm 0.05$, $n = 7$) als bei einem HP von -20 mV ($I_{150} = 0.51 \pm 0.03$, $n = 8$). hERG-Kanäle weisen also in der offenen oder inaktivierten Konformation eine schwächere ChT-Sensitivität auf als im geschlossenen Zustand. Weiterführend wurde untersucht, ob die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals einen Einfluss auf dessen ChT-Sensitivität hat. Weder eine Steigerung der Pulsfrequenz (Bild 3.5 B) noch eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit (Bild 3.5 C) führte zu Veränderungen des I_{200} -Wertes. Die Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit wurde dadurch erreicht, dass die Membran durchgängig auf einem HP von -60 mV gehalten wurde. Folglich ist die ChT-induzierte Stromreduktion unabhängig von der Aktivierungsfrequenz des Kanals. Wir nehmen an, dass die inaktivierte Konformation den

Kanal weniger zugänglich für ChT macht. Der Einfluss der Inaktivierung auf die ChT-Sensitivität des Kanals wird in Kapitel 3.4 noch einmal ausführlicher untersucht.

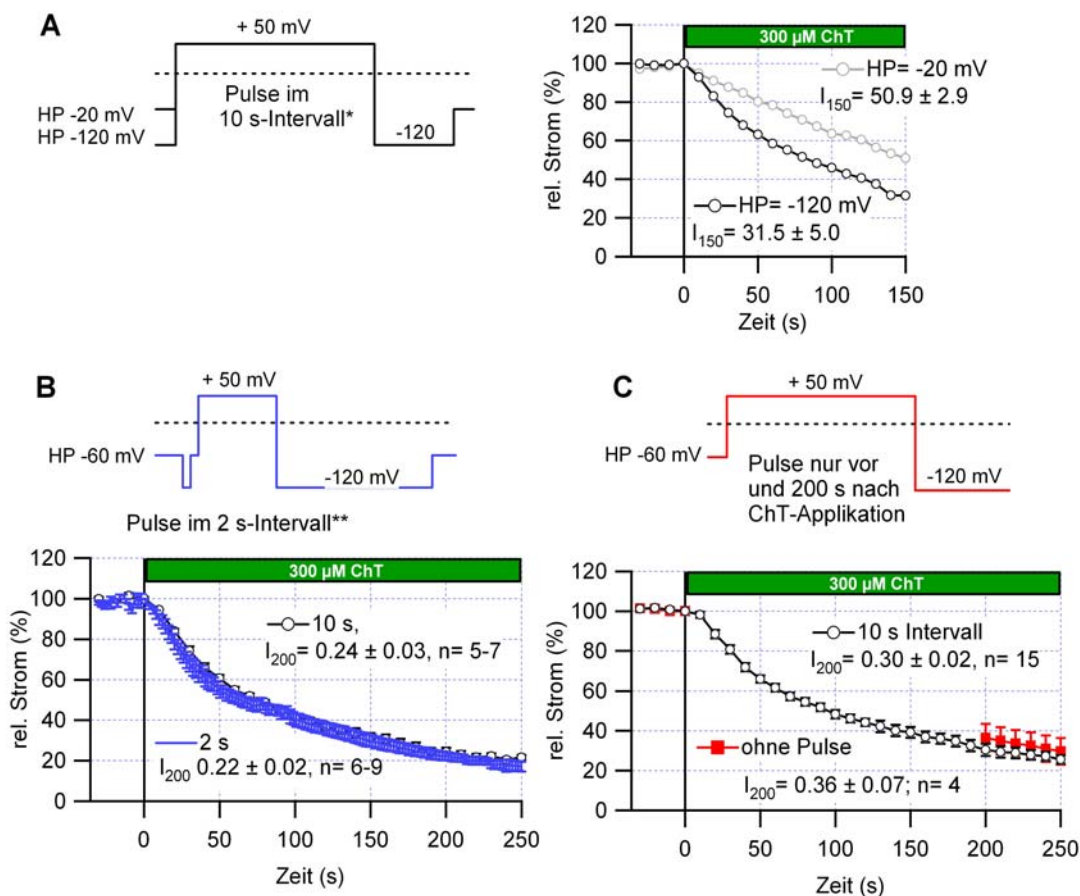


Bild 3.5: Abhängigkeit der ChT-induzierten Stromreduktion vom HP und der Pulsfrequenz

(A) Pulsprotokolle wurden mit -120 mV oder -60 mV als HP (*=ohne Leckstromsubtraktion) durchgeführt. Damit wurden die jeweiligen Amplitude-Zeit-Beziehungen von hERG bei ChT-Applikation ermittelt (für -120 mV mit $n = 7$; für -60 mV mit $n = 8$). (B) Pulsprotokoll mit 200 ms Depolarisationszeit und 400 ms Repolarisation im 2 s-Intervall durchgeführt. (**=statt der Leckströme wurden die Ströme des kurzen -120 mV-Pulses von den Einwärtsströmen abgezogen). Der Graph zeigt die mit diesem Protokoll generierte Amplitude-Zeit-Beziehung von hERG im Vergleich zum 10 s-Intervall. (C) Protokoll ohne depolarisierende Pulse während der ChT-Applikation und die damit generierte Amplitude-Zeit-Beziehung von hERG im Vergleich zum 10 s-Intervall.

3.2.4 Reversibilität der ChT-induzierten Stromreduktion

ChT modifiziert bei neutralen pH-Werten neben Met auch Cys (Shechter *et al.*, 1975). Eine der dabei möglichen Cys-Modifikationen besteht in der Ausbildung reversibler Disulfidbrücken. Die folgenden Experimente sollten klären, ob solche Disulfidbrücken an dem Stromverlust durch ChT beteiligt sind. Durch Applikation der membranpermeablen Substanz Dithiotreitol (DTT) können Disulfide wieder reduziert werden (Clenand, 1963) und im vorliegenden Fall gegebenenfalls die Anzahl funktionsfähiger Kanäle erhöht werden. Eine interne Applikation von 1 mM DTT schwächte die Amplitudenreduktion durch ChT deutlich ab (Bild 3.6 A). Wenn 500 μM DTT extern appliziert wurden, nach-

dem der ChT-Effekt schon partiell eingetreten war, führte dies zwar zu einem Abstoppen der Reaktion aber zu keinem Stromzuwachs (Bild 3.6 B). Aufgrund dieses Ergebnisses nahmen wir an, dass die ChT-induzierte Stromreduktion nicht auf einer reversiblen Disulfidbildung beruht.

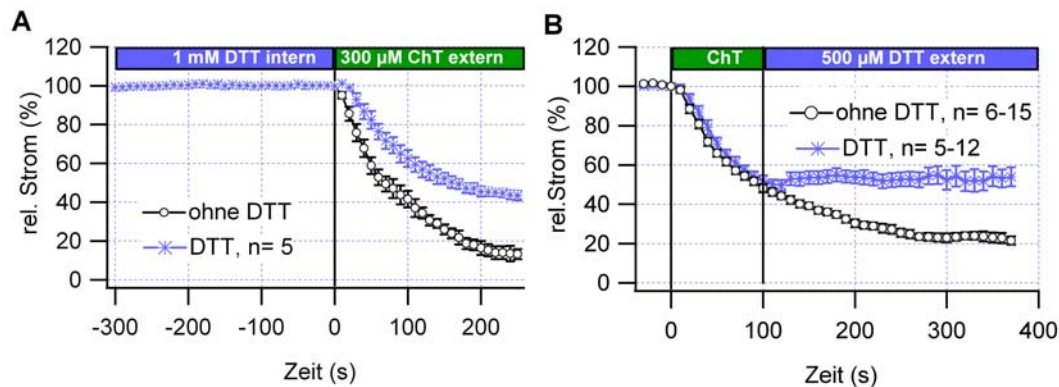


Bild 3.6: Wirkung von DTT auf die Sensitivität des hERG-WT gegenüber ChT

(A) 300 μM ChT wurden zum Zeitpunkt 0 appliziert und führten bei einer gleichzeitigen internen DTT-Applikation zu einer abgeschwächten Stromreduktion. Als Kontrolle (ohne DTT) wurde die ChT-induzierte Amplitudenreaktion des WT (ZR 3) verwendet. (B) Nach 10 Pulsen unter ChT wurden die Zellen mit 500 μM DTT gespült, welches auf den Zellen verblieb.

3.2.5 Modifikation der Schalteigenschaften durch ChT

Die hier als ChT-Effekt bezeichnete Hauptwirkung von ChT an hERG besteht in einer starken Abschwächung der Amplitude. Ob ChT auch die Schalteigenschaften der Kanäle modifiziert, soll im Folgenden geklärt werden. Wie in Bild 3.7 dargestellt, wurden die Zellen erst gespült, dann mit ChT behandelt und nach einem Abstoppen der Stromreduktion mit DTT die Schalteigenschaften der Kanäle am verbleibenden Reststrom ermittelt.

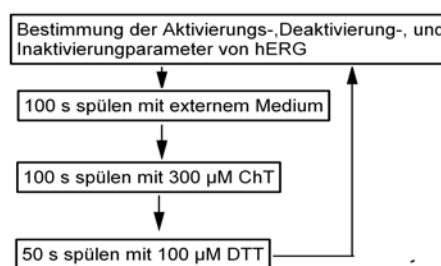


Bild 3.7: Ablauf der biophysikalischen Charakterisierung von hERG-WT nach Oxidation mit ChT
Der Amplitudenverlauf wurde kontinuierlich mit depolarisierenden Pulsen im 10 s-Intervall verfolgt. Das DTT verblieb bis zum Ende der Messung auf den Zellen.

Das Schaltverhalten von hERG wurde durch ChT gering modifiziert. Der Deaktivierungszeitverlauf bei -95 mV war nach der Behandlung mit ChT beschleunigt und die halbmaximale Inaktivierungsspannung ($V_{h_{\text{inakt}}}$) um circa 10 mV hin zu positiveren Potentialen verschoben (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Das hERG-WT Schaltverhalten vor und nach der ChT-Modifikation (*P<0.05)

Parameter		WT			(N)	WT nach 300 μ M ChT			(N)
Aktivierung	V_{h_akt} (mV)	-7.5	\pm	1.4	(10)	-6.1	\pm	1.6	(3)
	k_{h_akt} (mV)	9.9	\pm	0.2	(10)	10.3	\pm	0.9	(3)
	τ_{akt} (ms)	181.7	\pm	15.5	(7)	177.4	\pm	16.9	(7)
Deaktivierung	-145 mV	19.1	\pm	0.7	(5-7)	18.5	\pm	0.6	(5)
	-120 mV	34.1	\pm	1.2	(5-7)	29.3	\pm	1.1	(5)
	-95 mV	78.0	\pm	8.7	(5-7)	59.5	\pm	4.2*	(5)
Inaktivierung	55 mV	11.2	\pm	0.4	(11)	10.5	\pm	0.8	(5)
	30 mV	15.1	\pm	0.5	(11)	14.7	\pm	1.1	(5)
Rückkehr aus der Inaktivierung	V_{h_inakt} (mV)	-82.9	\pm	1.1	(12)	-69.7	\pm	3.3*	(5)
	k_{h_inakt} (mV)	13.9	\pm	0.3	(12)	14.4	\pm	0.5	(5)

3.2.6 ChT als möglicher Porenblocker

Für viele untersuchte Substanzen, die hERG blockieren, befindet sich die Bindestelle in der Porenregion des Kanals (Thomas *et al.*, 2006). Die Aromaten Tyr 652 und Phe 656 im S6 (Bild 3.9) sind besonders oft in solche Blockerbindungen involviert. Für Substanzen wie MK-499, Dofetilid, Budipin, Bepridil und Chloroquinin konnte gezeigt werden, dass eine Substitution beider oder eines der Aromaten mit Alanin zu einem verminderten Block führt (Lees-Miller *et al.*, 2000, Mitcheson *et al.*, 2000, Scholz *et al.*, 2003, Kamiya *et al.*, 2005, Sanchez-Chapula *et al.*, 2002). Die Kanalmutanten F656A und Y652A wurden biophysikalisch charakterisiert (A-3) und auf ihre ChT-Sensitivität hin untersucht. Wir schließen einen über diese Aromaten vermittelten Block der Kanalpore durch ChT aus, da hERG-F656A ($I_{200} = 0.28 \pm 0.06$, n= 4) und hERG-Y652A ($I_{200} = 0.23 \pm 0.05$, n= 4) keine vom WT ($I_{200} = 0.30 \pm 0.02$, ZR1) abweichende ChT-Sensitivität zeigten. Für viele hERG-blockierende Substanzen sind Tyr 652 und Phe 656 nicht die einzigen Reste, die für die jeweilige Bindung wichtig sind. So wurde zum Beispiel für Cisaprid und Terfenadin gezeigt, dass deren Bindung an den Kanal hauptsächlich über die Reste Val 625 und Gly 648 vermittelt wird (Mitcheson *et al.*, 2000). Um ein zusätzliches Argument gegen einen ChT-vermittelten Block aufführen zu können, wurde untersucht, ob eine ChT-ähnliche Substanz den Kanal blockieren kann. Dazu wurde eine Vorstufe des ChT, das p-Toluensulfonamid (p-Tsa), verwendet. Die externe Applikation von 300 μ M p-Tsa führte zu keiner Stromreduktion an hERG-WT. Nach der p-Tsa Behandlung waren die Zellen weiterhin ChT-sensitiv (Bild 3.8). Dieses Ergebnis unterstützt unsere Vermutung, dass ChT nicht als Blocker wirkt, sondern direkt AS des Kanals modifiziert.

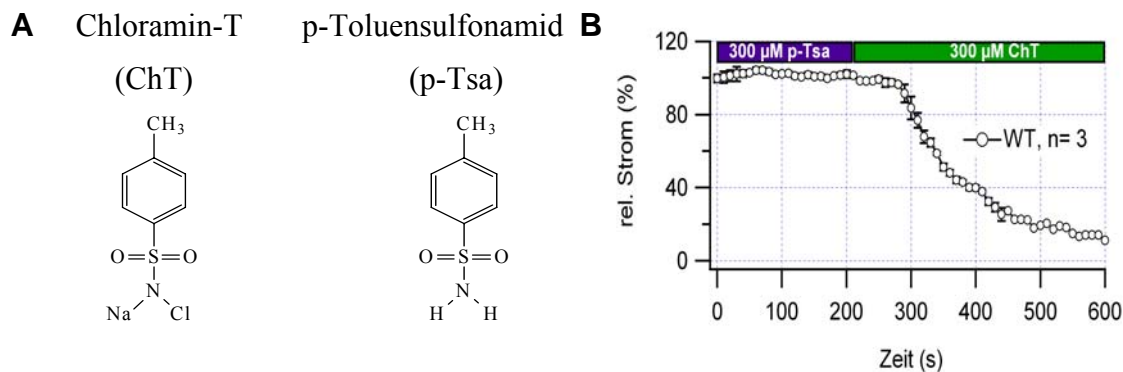


Bild 3.8: Struktur und Wirkung von p-Toluensulfonamid auf hERG-WT

(A) Die chemischen Formeln von ChT und p-Tsa. (B) Für die Dauer von 200 s wurden 300 μ M p-Tsa extern appliziert und verblieben auf den Zellen. Darauf folgte die Applikation von 300 μ M ChT.

3.2.7 Rolle der Histidine 578 und 587

Die Inkubation hERG-exprimierender Oozyten mit FeSO_4 / Fe/Asc führt zu einer Zunahme der hERG-Auswärtsströme. An bEAG1-Strömen hingegen kommt es durch FeSO_4 / Fe/Asc zu keiner Modifikation (Taglialatela *et al.*, 1997). Eine Substitution der Histidine im S5-S6-Verbindungsstück von hERG zu den entsprechenden AS des bEAG1-Kanals führt zur vollständigen Unempfindlichkeit gegenüber FeSO_4 / Fe/Asc (Pannaccione *et al.*, 2002).

Obwohl ChT sowohl bei hERG als auch bei hEAG1 zur schnellen Reduktion des Stromes führte, konnte eine Oxidation der Histidine durch ChT nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Daher wurde die Doppelmutante hERG-H578D/H587Y generiert. Die Schalteigenschaften dieser Doppelmutante waren dem WT sehr ähnlich (A-4). Bei einer Applikation von 300 μ M ChT verhielt sich hERG-H578D/H587Y ($I_{200} = 0.24 \pm 0.02$, $n = 5$) wie der WT ($I_{200} = 0.23 \pm 0.05$, ZR 5). Daher wurde ausgeschlossen, dass die Stromreduktion durch ChT über diese Histidine vermittelt wird.

3.3 Rolle der Methionine bei der Stromreduktion durch ChT

Um die durch ChT oxidierbaren Met zu identifizieren, wurden zuerst mit Hilfe von N- und C-terminalen Deletionsmutanten größere Bereiche des Kanalproteins ausgeschlossen (Bild 3.9).

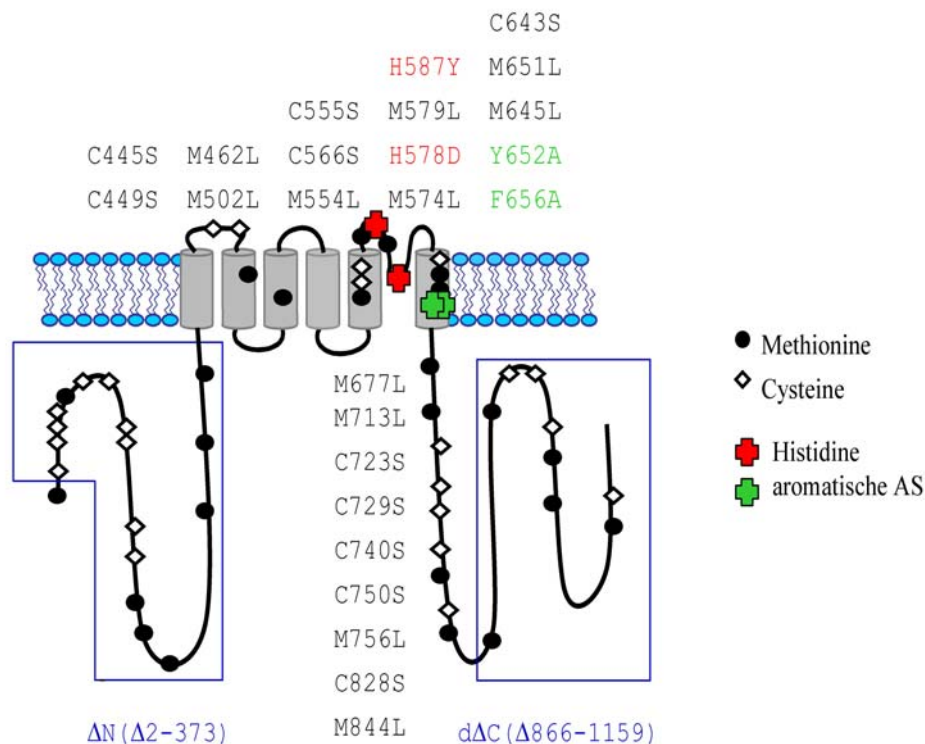


Bild 3.9: Skizze einer hERG α-UE

N- und C-terminale Deletionen sind blau umrandet. Skizzierte Anordnung aller, abzüglich der deletierten Bereiche, verbleibenden Met (schwarzer Kreis) und Cys (offene Raute) im Kanalprotein. Zusätzlich sind die Positionen der Histidine (rotes Kreuz) im S5-S6-Verbindungsstück sowie die der Porenaromaten Tyr 652 und Phe 656 (grünes Kreuz) eingezeichnet.

Die Kanalmutanten hERG-ΔN (Δ2-373) und hERG-dΔC (Δ866-1159) zeigten beide weiterhin eine starke Reduktion der Stromamplitude durch ChT (Bild 3.10). Die AS dieser Bereiche sind demnach nicht maßgeblich an der Stromreduktion durch ChT beteiligt. Die I_{200} -Werte für ΔN waren im Vergleich zu dem WT der ZR 3 nicht signifikant kleiner, aber der Zeitverlauf der ChT-Stromreduktion war für ΔN deutlich beschleunigt (siehe Übersicht, Bild 3.13 B). Die biophysikalischen Eigenschaften dieser Deletionsmutanten sind in den Tabellen A-5 bis A-8 aufgeführt. Besonders auffällig war die Beschleunigung der Deaktivierung von ΔN mit $\tau_{\text{deact}}(-120\text{mV}) = 17.9 \pm 0.4 \text{ ms}$ im Vergleich zum WT mit $\tau_{\text{deact}}(-120\text{mV}) = 36.2 \pm 1.1 \text{ ms}$ (Bild 3.10 C).

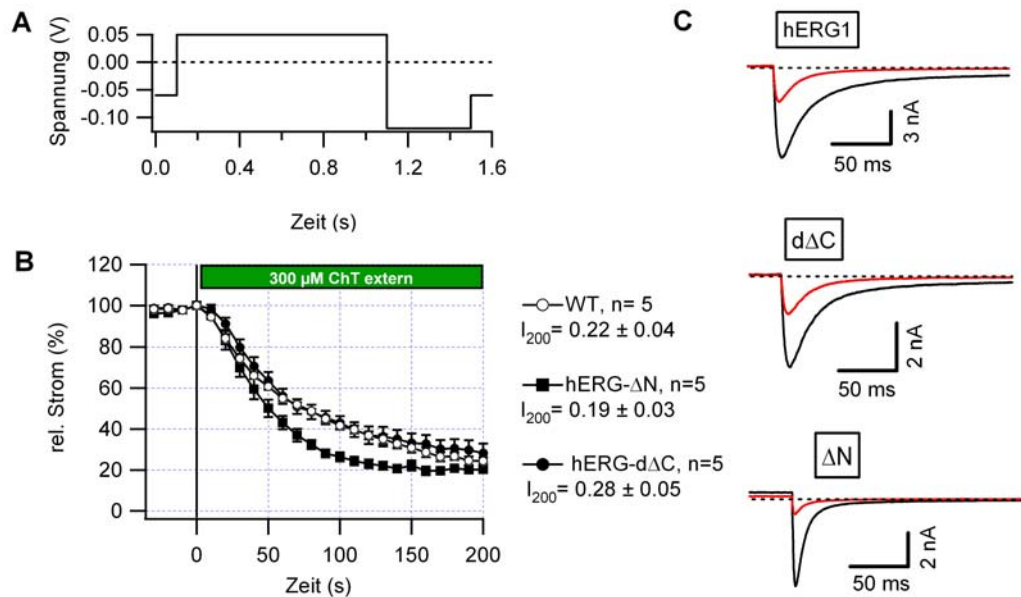


Bild 3.10: ChT-induzierte Stromreduktion der terminalen Deletionsmutanten von hERG

(A, B) Pulsprotokoll und Amplitude-Zeit-Beziehungen der Stromreduktion durch ChT. (C) Vergrößerte Darstellung der generierten Einwärtsströme bei einer Repolarisierung auf -120 mV für WT, dΔC und ΔN jeweils vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) der Applikation von 300 μM ChT.

Die verbleibenden 11 Met wurden als Einzelmutationen durch Leucin ersetzt. Leucin weist einen ähnlichen Van-der-Waals-Radius und mit Met vergleichbare Hydrophobizitätswerte auf (Black und Mould, 1991), ist aber wesentlich stabiler gegenüber Oxidationen. Es wird angenommen, dass Substitutionen von Met durch Leucin die Proteinstrukturen nicht stark verändern (Kim *et al.*, 2001). Dafür spricht, dass alle Kanalmutanten einen WT-ähnlichen Strom mit schneller Aktivierungs- und sehr schneller Inaktivierungskinetik generierten. Dennoch zeigten einige Mutanten mit $P < 0.05$ signifikante Veränderungen ihres Schaltverhaltens (A-5 bis A-8). So wiesen M462L, M554L und M713L eine beschleunigte Aktivierungskinetik auf, deren Spannungsabhängigkeit hin zu negativeren Potentialen verschoben war (A-5). Eine verlangsamte Deaktivierungskinetik bei allen drei untersuchten Spannungen zeigten M554L, M645L und M651L (A-6). Modifikationen an diesen Positionen würden also zu Kanälen führen, die verstärkt zur Repolarisation des AP beitragen.

Die bei den 11 Kanalmutanten beobachteten Modifikationen des Inaktivierungsverhaltens traten häufiger auf und waren weniger einheitlich (A-7, A-8). Besonders auffällig jedoch war die Modifikation der Inaktivierungskinetik von M645L. Diese Mutante inaktiviert viel schneller ($\tau_{\text{inakt}}(+55 \text{ mV}) = 0.65 \pm 0.05 \text{ ms}$) als der WT ($\tau_{\text{inakt}}(+55 \text{ mV}) = 10.1 \pm 0.3 \text{ ms}$), so dass die Messungen von τ_{inakt} und V_{h_inakt} mit einem angepassten Protokoll (siehe 2.2.2.2) vorgenommen wurden. Eine Generierung der physiologisch bedeutsamen Auswärtsströme sollte in dieser Mutante stark eingeschränkt sein. Tatsächlich wurde bei einem Patienten

mit Herzfehler und neonataler Bradykardie die Mutation M645L im hERG-Kanal identifiziert (Lupoglazoff *et al.*, 2004). Zusammenfassend kann man daher sagen, dass die physikalischen und chemischen Eigenschaften der AS in den Positionen 462, 554, 645, 651 und 713 an der Ausbildung der WT-Schalteigenschaften des Kanals beteiligt sind. Die Sensitivität gegenüber 300 μ M ChT wurde für alle 11 Einzelmutanten ermittelt. In Bild 3.11 werden die Zeitverläufe der Amplitudenabschwächung durch ChT im Vergleich zu den jeweils dazugehörigen WT-Messungen gezeigt. M645L zeigte eine gesteigerte ChT-Sensitivität. Die Amplitude-Zeit-Beziehungen der übrigen Kanalmutanten deuteten auf jeweils nur gering vom WT abweichende ChT-Sensitivitäten hin.

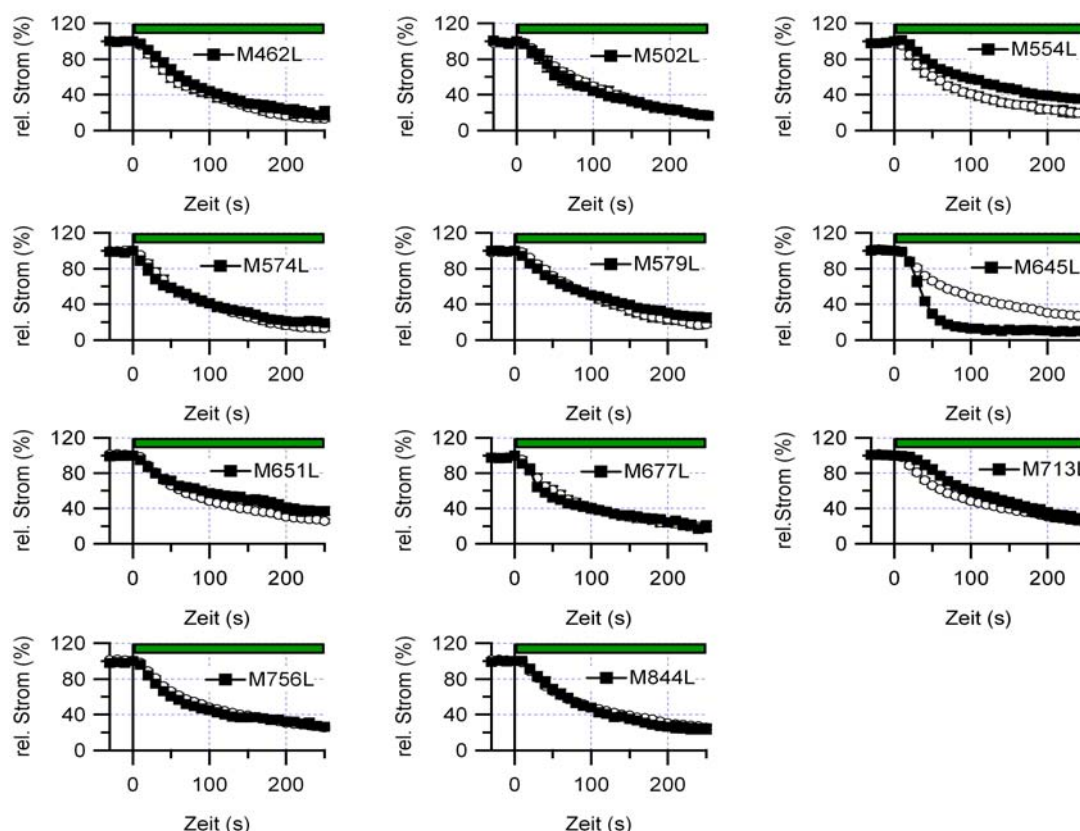


Bild 3.11: ChT-induzierte Stromreduktion von 11 Met-Substitutionsmutanten

Die Amplitudenabschwächung durch 300 μ M ChT (grüner Balken) wurde für jede Mutante mit der jeweils entsprechenden hERG-WT Zellreihe (offener Kreis) verglichen.

Santarelli *et al.* (2006) zeigten für den BK-Kanal, dass mehrere Met an einer oxidativen Modulation der Kanaleigenschaften beteiligt sind. Wobei nur deren gleichzeitige Substitution zu einem vollständig ChT-unsensitiven BK-Kanal führte, während die jeweiligen Einzeleffekte minimal waren. In der vorliegenden Arbeit wurden drei der Met-Substitutionsmutanten miteinander kombiniert. Dabei fiel die Wahl auf M554L, M651L und M713L, da deren Amplitude-Zeit-Beziehungen zumindest tendenziell auf eine leicht abgeschwächte Stromreduktion durch ChT schließen ließ (Bild 3.11). Es wurden

hERG-M554L/M651L/M713L (3Met) und hERG- Δ N/M554L/M651L/M713L (Δ N/3Met) generiert und gezeigt, dass diese Kombinationsmutanten höhere I_{200} -Werte aufwiesen als der WT oder Δ N (Bild 3.12).

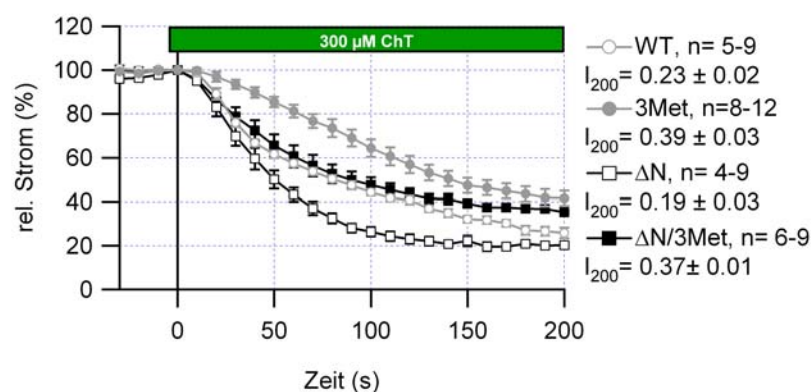


Bild 3.12: ChT-Sensitivität der 3Met-Mutante im WT- beziehungsweise Δ N-Hintergrund

Die Messungen der ChT-Sensitivität von hERG-3Met (grauer Kreis, gefüllt) wurden bei einem HP von -90 mV vorgenommen, ebenso die dazugehörigen WT-Kontrollen der ZR 2 (grauer Kreis, offen). hERG- Δ N (schwarzes Quadrat, offen) und hERG- Δ N/3Met (schwarzes Quadrat, gefüllt) wurden bei einem HP von -60 mV gemessen.

Eine zusammenfassende Auswertung der in den Bildern 3.10, 3.11 und 3.12 gezeigten Diagramme gibt Bild 3.13. Hier wurden die I_{200} - und τ_{ChT} -Werte aller bisher generierten Met- und Deletionsmutanten ermittelt und zur besseren Übersichtlichkeit mit nur einem WT verglichen. Dazu wurden I_{200} und τ_{ChT} aller WT-Messungen (ZR 1 bis 6) gemittelt, als $\text{WT}_{(\text{Mittel})} \pm \text{SEM}_{(\text{Mittel})}$ bezeichnet und anhand der schraffierten Flächen dargestellt. Der in diesen Balkendiagrammen vorgenommene Vergleich mit einem gemittelten WT ergab mehrere Einzelmutanten, die zumindest in einem der beiden Parameter signifikant ($P < 0.05$) vom WT abwichen. Die ChT-Sensitivitäten von 3Met und M645L waren deutlich unterschiedlich gegenüber der des WT, da jeweils beide Parameter signifikant ($P < 0.005$) vom WT abwichen (Bild 3.13). Die abgeschwächte Stromreduktion von 3Met deutete darauf hin, dass M554, M651 und M713 tatsächlich durch ChT modifiziert werden, auch wenn sie einzeln nur zu einem geringen Teil zur Stromreduktion beitragen.

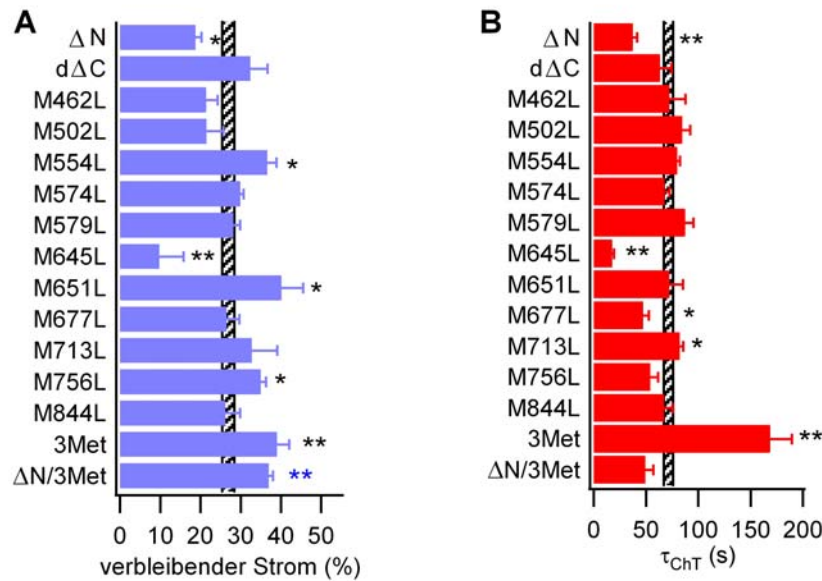


Bild 3.13: Diagramme des verbleibenden Stromes ($I_{200} \times 100 \%$) und der Zeitkonstanten (τ_{ChT})

(A) Für jede Kanalmutante wurde der verbleibende Strom ($I_{200} \times 100 \%$) als blauer Balken \pm SEM dargestellt. Die schraffierte Fläche entspricht dem verbleibenden Strom des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$. (B) Die Zeitkonstante (τ_{ChT}) wurde für jede Kanalmutante als roter Balken \pm SEM abgebildet. Die schraffierte Fläche entspricht den Zeitkonstanten des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$. (* $P < 0.05/WT$, ** $P < 0.005/WT$, *** $P < 0.005/\Delta N$)

Die Kanalmutanten M554L, M651L und M713L wichen in ihren Schalteigenschaften auffällig vom WT ab. Es erfolgte auch eine Charakterisierung der Kombinationsmutanten 3Met und $\Delta N/3Met$ hinsichtlich ihrer Schalteigenschaften (A-5 bis A-8). Da 3Met schon bei Spannungen um die -60 mV aktiviert und dann sehr langsam deaktiviert, wurde hier ein HP von -90 mV gewählt, um ein Schließen der Kanäle zwischen den Pulsen zu gewährleisten. Für die $\Delta N/3Met$ -Mutante war dies aufgrund der schnellen Deaktivierungskinetik nicht notwendig. Sowohl 3Met als auch $\Delta N/3Met$ zeigten eine negative Verschiebung von $V_{h_{akt}}$ um 25 beziehungsweise 30 mV sowie eine Beschleunigung im Zeitverlauf der Aktivierung (A-5). Der Zeitverlauf der Deaktivierung von 3Met war bei allen drei untersuchten Spannungen, wie bei den Einzelmutanten M554L und M651L auch, deutlich verlangsamt. Bei -120 mV und -95 mV deaktivierte $\Delta N/3Met$ ebenfalls deutlich langsamer als ΔN (A-6). Das heißt, dass Mutationen an den Positionen 554 und 651 die Deaktivierungsgeschwindigkeit des Kanals in einer Weise reduzieren, die unabhängig von der N-terminalen Deaktivierungsregulation erfolgt. Die an den drei Einzelmutanten beobachteten Veränderungen der Kanalaktivierung, Deaktivierung und ChT-Sensitivität summierten sich demnach bei einer Kombination zu 3Met beziehungsweise $\Delta N/3Met$.

3.4 Zusammenhang von ChT-Sensitivität und Schaltverhalten

3.4.1 Deaktivierung

In Abschnitt 3.2.5 wurde gezeigt, dass die Deaktivierungskinetik von hERG durch ChT leicht beschleunigt wird. Je schneller aber die Deaktivierung von hERG wird, umso weniger Kanäle können an der Generierung des einwärtsgerichteten Stromes beteiligt sein. Daher stellte sich die Frage, ob die abgeschwächte ChT-Sensitivität von 3Met darauf beruht, dass an dieser Kanalmutante die Beschleunigung der Deaktivierung nicht mehr stattfinden kann. Deshalb wurden τ_{deakt} bei -120mV für jeweils den letzten Puls vor ChT-Applikation (3Met: $\tau = 56.2 \pm 2.3$ ms, WT: $\tau = 36.0 \pm 1.8$ ms) und für 200 s danach (3Met: $\tau = 22.7 \pm 6.4$ ms, WT: $\tau = 21.3 \pm 0.8$ ms) ermittelt. An 3Met fand eine, mit dem WT vergleichbare, Reduktion der Deaktivierungszeitkonstante statt. Die beim WT an der Deaktivierungsbeschleunigung durch ChT beteiligten Strukturen sind in 3Met also noch funktionell. Die abgeschwächte ChT-Sensitivität von 3Met beruht demnach auf anderen Mechanismen.

3.4.2 Inaktivierung

In der Arbeit von Schlieff *et al.* (1996) wurde gezeigt, dass in *Shaker*-Kanälen eine Beschleunigung beziehungsweise Verlangsamung der C-Typ-Inaktivierung mit dem Zeitverlauf der Stromreduktion durch ChT korreliert. In hERG sind die Reste Ser 620 und Ser 631 als wichtige Determinanten der C-Typ-Inaktivierung identifiziert worden (Herzberg *et al.*, 1998). Werden diese Reste mit den entsprechenden AS des nicht inaktivierenden hEAG1-Kanals (Thr 432 und Ala 443) substituiert, erhält man hERG-Kanäle, deren Inaktivierungsfähigkeit stark beeinträchtigt ist. So ist bei S631A die halbmaximale Inaktivierungsspannung um circa +120 mV verschoben, während S620T die Inaktivierung des Kanals vollständig verhindert (Vandenberg *et al.*, 2004). Es wurden die ChT-Sensitivitäten von S620T und der schnell inaktivierenden Mutante M645L (A-7) im Vergleich zum WT untersucht. M645L zeigte dabei eine stärkere und S620T eine deutlich schwächere Stromreduktion als der WT (Bild 3.14). Deshalb vermuten wir für hERG eine Korrelation zwischen der C-Typ-Inaktivierung und dem Zeitverlauf der Stromreduktion durch ChT. Jedoch beeinflussen die durch Mutationen generierten Veränderungen der Inaktivierung die ChT-Sensitivität in umgekehrter Weise, wie wir es für Veränderungen des Inaktivierungsstatus am WT dargestellt haben (Bild 3.5 A).

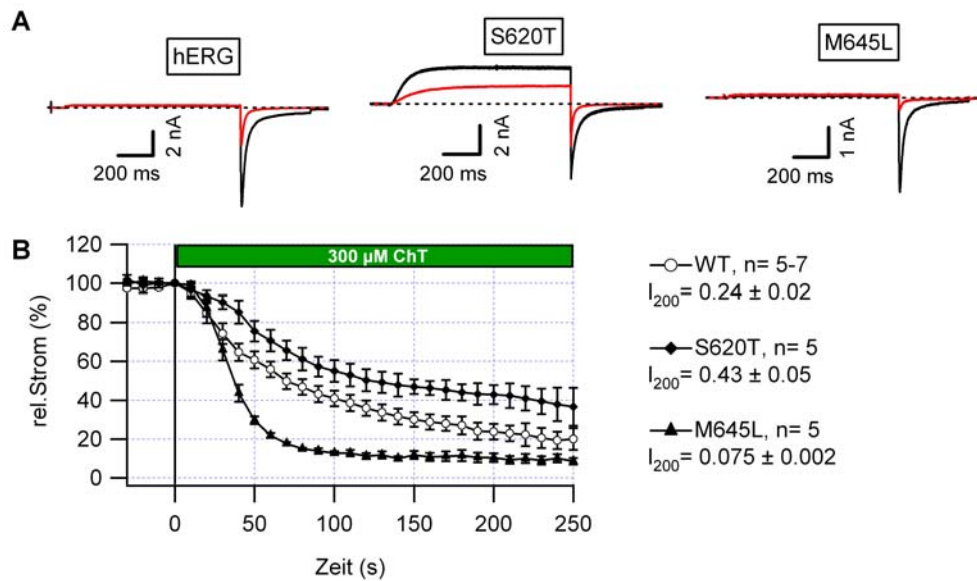


Bild 3.14: ChT-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutanten M645L und S620T

(A) Repräsentative Stromspuren von WT, hERG-S620T und hERG-M645L jeweils vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) der ChT-Applikation. (B) Die ChT-Sensitivität wurde für hERG-M645L und WT an den Einwärtsströmen und für hERG-S620T an den Auswärtsströmen bestimmt.

Die C-Typ-Inaktivierung von hERG kann auch auf den hEAG-Kanal übertragen werden. So führt die Substitution von Thr 432 und Ala 443 in hEAG1 durch die in hERG vorkommenden Serinreste zu einem inaktivierenden hEAG1 (Ficker *et al.*, 2001). Diese inaktivierende hEAG1-Mutante wies im Vergleich zu hEAG1-WT eine reduzierte ChT-Sensitivität auf (Bild 3.15).

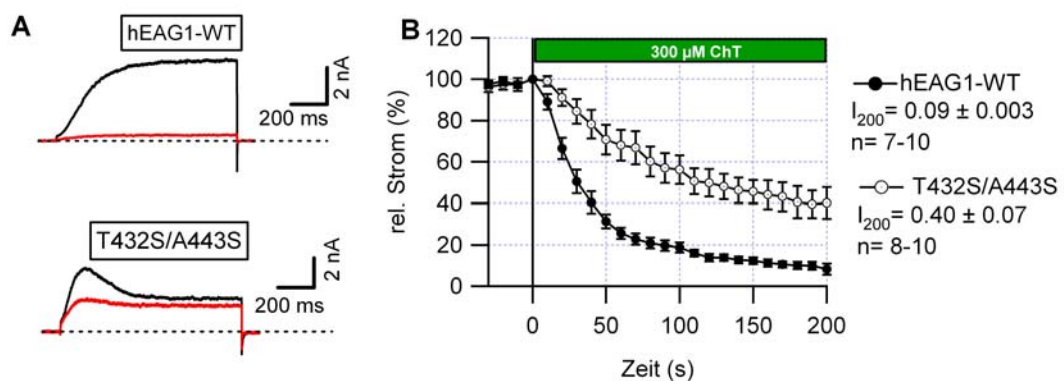


Bild 3.15: ChT-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutante hEAG1/T432S/A443S

(A) Repräsentative Stromspuren von hEAG1-WT und hEAG1-T432S/A443S jeweils vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) der ChT-Applikation. hEAG1-WT inaktiviert nicht, während die Auswärtsströme von hERG-T432S/A443S bei anhaltender Depolarisation abnehmen. (B) Die ChT-induzierte Stromreduktion wurde jeweils anhand der Auswärtsströme bestimmt.

Demnach führen Mutationen, welche das Inaktivierungsverhalten beeinflussen, sowohl in hERG als auch in hEAG1 zu Veränderungen der ChT-Sensitivität. In hERG führte eine

Abschwächung und in hEAG1 eine Verstärkung der Inaktivierungseigenschaften zur Reduktion der ChT-Sensitivität.

3.5 Effekt von Cystein-modifizierenden Substanzen auf hERG

Im nativen System wurden für Cys indirekte oxidative Modifikationen durch GSH und Malondialdehyd (Lii *et al.*, 1994, Haberland *et al.*, 1988) sowie direkte Modifikationen über Singulett-Sauerstoff beschrieben (Balasubramanian *et al.*, 1990). Eine chemische Modifikation von Cys mit Methanthiosulfonaten (MTS) führt zur Bildung von gemischten Disulfiden. Durch diese Interaktion kann sich die Konformation eines Kanals, das elektrische Feld um den Spannungssensor oder die sterischen Bedingungen im Ionen-permeationsweg verändern. Ob und wie Cys durch MTS-Substanzen modifiziert werden, kann daher über die Lage und Umgebung sowie über die Erreichbarkeit der jeweiligen SH-Gruppen für endogene ROS Aufschluss geben.

Wir haben den Effekt der Cys-modifizierenden Substanzen MTSES, MTSEA und DTNB auf die Stromamplitude des hERG-WT untersucht. Alle drei Substanzen wurden intern mit der *patch*-Pipette appliziert und führten zu Abschwächungen der Stromamplitude (Bild 3.16). Dies lässt vermuten, dass ein oder mehrere Cys im Kanal für intrazelluläre Substanzen zugänglich sind und deren Modifikation zu einer Reduktion der Stromamplitude führt.

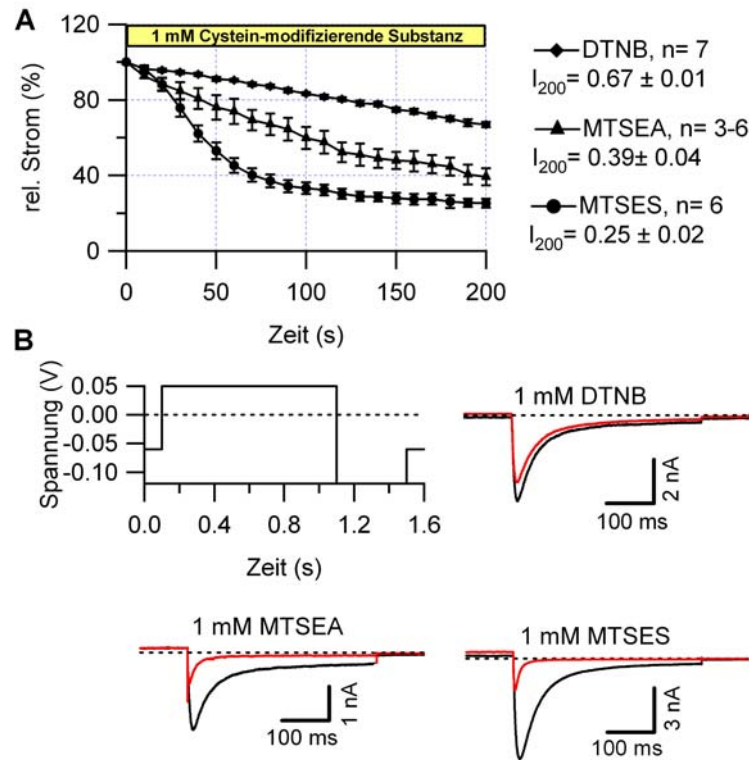


Bild 3.16: Effekte der Cys-Modifizierer DTNB, MTSEA und MTSES an hERG-WT

(A) Die *patch*-Pipette enthielt jeweils 1 mM DTNB (Rhombus), 1 mM MTSEA (Dreieck) und 1 mM MTSES (Kreis). (B) Repräsentative Stromspuren von hERG-WT vor (schwarze Spur) und 300 s nach (rote Spur) Beginn der Amplitudenabschwächung durch DTNB, MTSEA beziehungsweise MTSES.

3.5.1 Charakterisierung des MTSES-Effektes an hERG

Die Modifikation von Cys in hERG führte, wie die Behandlung mit ChT auch, zu einer Reduktion der Stromamplitude. Für weiterführende Experimente wurde MTSES gewählt, da es den Strom am stärksten abschwächte. Die Variabilität des MTSES-Effektes war höher als bei den Messungen mit ChT, deshalb wurden nur Daten, die innerhalb von 48 h gemessen wurden, miteinander verglichen.

Zuerst wurde geprüft, wie MTSES auf den endogen exprimierten hERG-Strom in Neuroblastomzellen wirkt. In SH-SY5Y-Zellen kam es zu einer Abschwächung der hERG-Stromamplitude, die jedoch geringer war als in mit hERG-DNA transfizierten HEK293-Zellen (Bild 3.17).

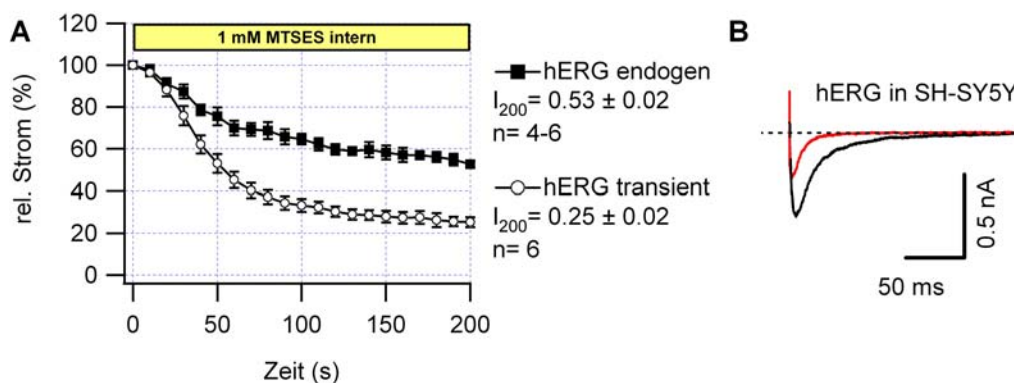


Bild 3.17: MTSES-Sensitivität der hERG-Ströme in Neuroblastomzellen

(A) Abschwächung der Stromamplitude von hERG in Neuroblastomzellen im Vergleich zu transientem hERG-WT in HEK293-Zellen. (B) Einwärtsstrom einer SH-SY5Y-Zelle vor (schwarze Spur) und 200 s nach (rote Spur) Beginn der Amplitudenabschwächung durch 1 mM MTSES.

3.5.2 MTSES an den Kaliumkanälen Kv1.5 und hEAG1

Da endogener hERG eine Stromreduktion durch MTSES erfährt, wurde getestet, ob diese Amplitudenreduktion spezifisch für bestimmte Kanäle ist. Es zeigte sich, dass MTSES eine starke Stromreduktion an den beiden Kanälen der EAG-Familie verursachte, nicht aber an hKv1.5 (Bild 3.18).

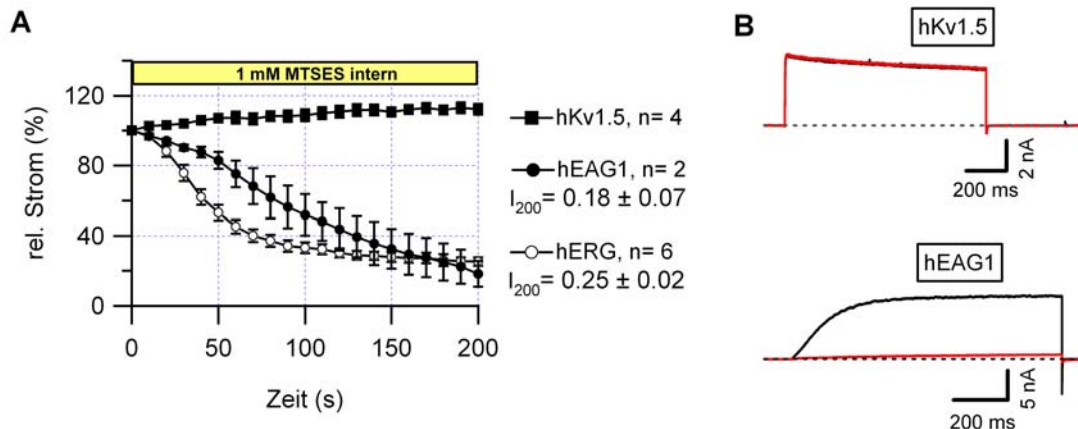


Bild 3.18: Die MTSES-Sensitivität von hKv1.5, hEAG1 und hERG im Vergleich

(A) Depolarisation der hEAG1-Kanäle erfolgte auf +50 mV für 1 s von einem HP von -60 mV aus (HP -80 mV für hKv1.5) im Intervall von 10 s. Die Auswärtsströme von hEAG1 und hKv1.5 wurden am Ende der depolarisierenden Pulse aufgenommen. (B) Repräsentative Stromspuren von hEAG1 und hKv1.5 vor (schwarze Spur) und nach (rote Spur) Beginn der Amplitudenabschwächung durch 1 mM MTSES.

3.5.3 Modifikation MTSES-behandelter Zellen mit ChT

Eine externe Applikation von 300 μ M ChT am verbleibenden MTSES-Strom von hERG-WT führte zu keiner weiteren Abschwächung der Amplitude (Bild 3.19). Dies legte die Vermutung nahe, dass die Stromreduktion durch ChT und MTSES durch Modifikation

der gleichen Cys generiert wird. Der sowohl bei ChT- als auch bei MTSES-Applikation verbleibende Strom könnte durch Kanäle generiert werden, die eine höhere Resistenz gegenüber diesen oxidativen Modifikationen aufweisen.

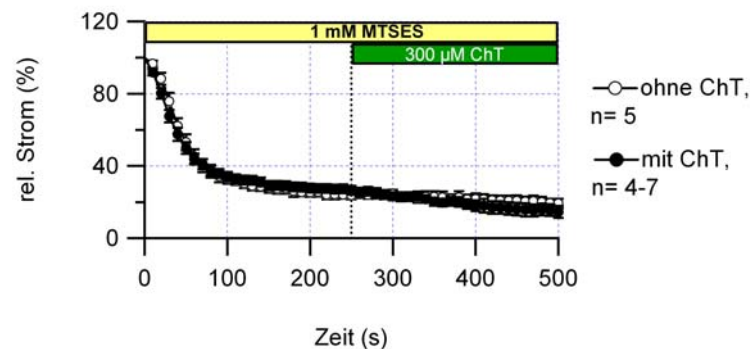


Bild 3.19: Wirkung von ChT nach dem Eintreten der MTSES-Stromreduktion

25 Pulse nach Beginn der Amplitudenreduktion durch MTSES wurden 300 µM ChT extern appliziert und verblieben auf den Zellen.

3.5.4 Modifikationen der Schalteigenschaften durch MTSES

Der Haupteffekt von MTSES an hERG-Kanälen ist eine Abschwächung der Stromamplitude. Die Möglichkeit einer Modifikation der Schalteigenschaften des Kanals durch MTSES, wurde nachfolgend untersucht. Ein Vergleich der Schalteigenschaften, vor und nach einer MTSES-Behandlung der jeweils gleichen Zelle war aufgrund der Applikation über die *patch*-Pipette nicht möglich. Die MTSES-induzierte Stromreduktion wurde deshalb nach 150 s mit einer externen Applikation von 500 µM DTT abgestoppt. Dieses Abstoppen der Amplitudenreduktion ermöglichte die jeweiligen Protokolle zur Ermittlung der hERG-Parameter an einem konstanten Reststrom durchzuführen und mit den WT-Schalteigenschaften zu vergleichen (Tabelle 3.2). Die Veränderungen der Schalteigenschaften des Kanals durch MTSES waren umfangreicher als die bei einer Oxidation des Kanals mit ChT. Die Aktivierung des Kanals setzt bei negativeren Potentialen ein und weist einen beschleunigten Zeitverlauf auf. Zudem ist die Deaktivierung beschleunigt und die Inaktivierung verlangsamt.

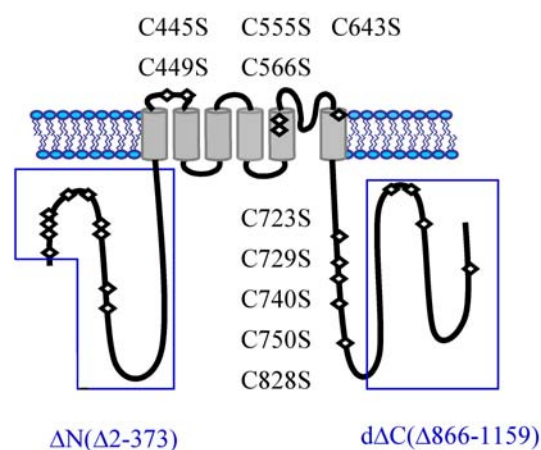
Tabelle 3.2: Biophysikalische Analyse von hERG nach MTSES/DTT Behandlung (*P<0.05)

		WT	WT mit 1 mM MTSES intern	(N)
Aktivierung	V_{h_akt} (mV)	-3.2 \pm 1.2	-15.9 \pm 4.0 *	(5)
	k_{h_akt} (mV)	9.7 \pm 0.2	18.1 \pm 2.1 *	(5)
	τ_{akt} (ms)	201.9 \pm 13.5	115.3 \pm 9.7 *	(5)
Deaktivierung	-145 mV	21.3 \pm 0.8	16.2 \pm 1.5 *	(5)
	-120 mV	36.2 \pm 1.1	22.6 \pm 1.9 *	(5)
	-95 mV	73.8 \pm 3.2	36.7 \pm 4.6 *	(5)
Inaktivierung	55 mV	10.1 \pm 0.3	9.5 \pm 0.9	(5)
	30 mV	13.9 \pm 0.4	16.7 \pm 1.5 *	(5)
Rückkehr aus	V_{h_inakt} (mV)	-84.2 \pm 1.0	-90.1 \pm 5.0	(5)
der Inaktivierung	k_{h_inakt} (mV)	15.7 \pm 0.5	22.8 \pm 1.4 *	(5)

3.6 Molekulare Grundlagen der MTSES-induzierten Stromreduktion

Aus Arbeiten über das S5-P-Verbindungsstück von hERG ist bekannt, dass eine Applikation von MTSES, MTSET, H₂O₂ oder DTT von der externen Seite aus nicht zu einer Reduktion des Stromes führt (Dun *et al.* 1999a, Fan *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2002). Für eine externe Applikation von 1 mM MTSES an mit hERG transfizierten HEK293-Zellen wurde dies bestätigt ($I/I_{K_{nach\ 400\ s}} = 0.98 \pm 0.04$, n= 2).

Wir gehen davon aus, dass die extern erreichbaren Cys an den Positionen 445, 449, 555, 566 und 643 (Bild 3.20) entweder nicht reaktiv mit MTSES sind oder deren Reaktion zu keiner Beeinflussung der Amplitude führt.

**Bild 3.20:** Skizzierte hERG α-UE mit Cys

Alle Cys sind als Rauten eingezeichnet. Für die Cys außerhalb der deletierten Bereiche sind die jeweiligen Positionen im Kanalprotein angegeben.

Unser Interesse galt der Identifizierung intrazellulärer Cys, die für die MTSES Reaktivität des Kanals verantwortlich sein könnten. Zuerst wurden die C- und N-terminalen Deletionsmutanten auf ihre MTSES-Sensitivität hin untersucht (Bild 3.21). Während dΔC eine dem WT-ähnliche Amplitudenabschwächung erfuhr, zeigte ΔN eine deutlich reduzierte MTSES-Sensitivität. Dies deutete entweder darauf hin, dass im WT N-terminale Cys modifiziert werden oder dass das Fehlen des N-Terminus Konformationsänderungen bewirkt, die den Kanal weniger sensitiv machen.

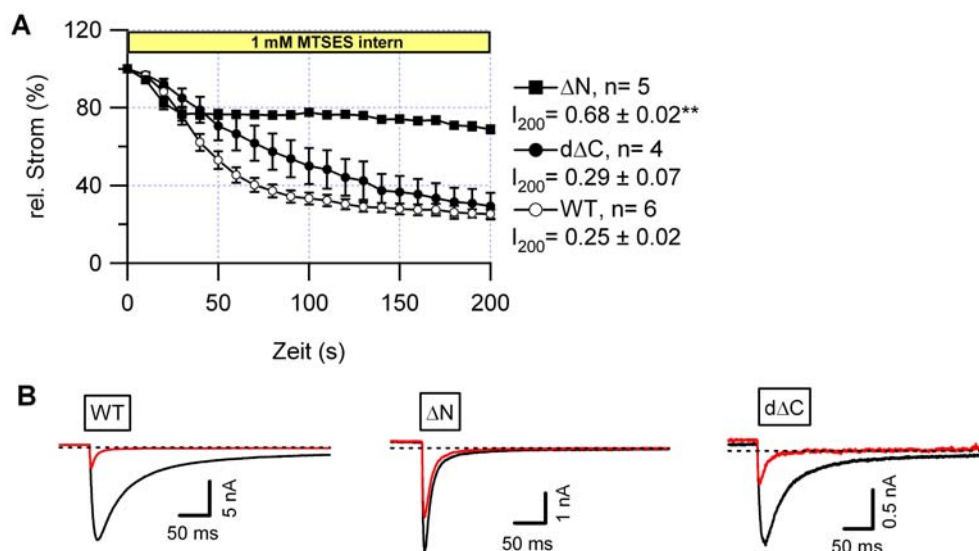


Bild 3.21: MTSES-Sensitivität der ΔN- und dΔC-Deletionsmutanten im Vergleich zum WT

(A) ΔN war deutlich resistenter gegenüber MTSES als der WT. (B) Stromspuren von WT, ΔN und dΔC vor (schwarze Spur) und 300 s nach (rote Spur) dem Einsetzen der MTSES induzierten Stromreduktion. (** $P < 0.005$ /WT)

Da ΔN noch nicht vollständig unsensitiv war, wurde untersucht, auf welchen Cys die verbleibende MTSES-Reaktivität beruht. Nach Ausschluss der in den Deletionsmutanten enthaltenen und der mit externen MTS-Substanzen erreichbaren Reste verblieben die 5 Cys an den Positionen 723, 729, 740, 750 und 828 (Bild 3.20). Diese wurden einzeln mit Serin substituiert und bezüglich ihrer Schalteigenschaften (A-9 bis A-12) und ihrer MTSES-Reaktivität charakterisiert. Dabei zeigte C723S ($I_{200} = 0.61 \pm 0.03$) eine mit $P < 0.005$ und C740S ($I_{200} = 0.42 \pm 0.02$) eine mit $P < 0.05$ signifikant geringere Stromreduktion als der WT ($I_{200} = 0.29 \pm 0.01$) (Bild 3.22).

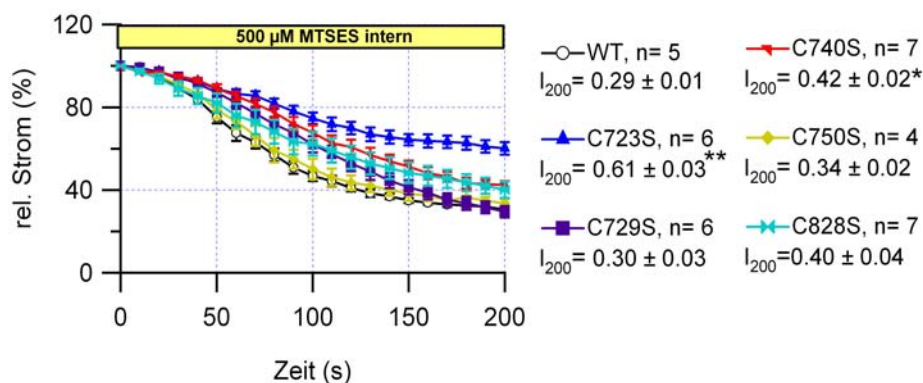


Bild 3.22: MTSES-Sensitivität der 5 intrazellulären Cys-Substitutionsmutanten

Stromreduktion der fünf intrazellulären Substitutionsmutanten bei interner Applikation von 500 μ M MTSES im Vergleich zum WT. (** $P < 0.005/\text{WT}$, * $P < 0.05/\text{WT}$)

Die anderen drei Kanalmutanten zeigten eine WT-ähnliche MTSES-Sensitivität. Wir konnten zeigen, dass C723S einzeln kombiniert mit ΔN zu dem MTSES-unsensitiven Kanal $\Delta\text{N}/\text{C723S}$ mit $I_{200} = 0.99 \pm 0.04$ führte (Bild 3.23). Folglich beruht die bei der ΔN -Mutante verbleibende MTSES-Sensitivität ausschließlich auf der Modifikation von C723.

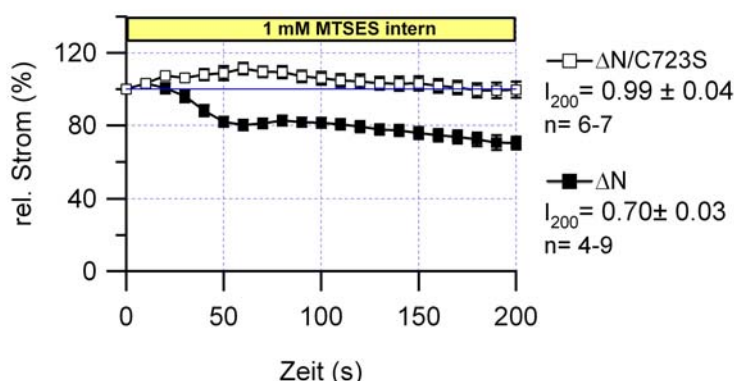


Bild 3.23: MTSES-Sensitivität der Kanalmutante hERG- $\Delta\text{N}/\text{C723S}$

Die Kanalmutante hERG- $\Delta\text{N}/\text{C723S}$ ist unsensitiv gegenüber 1 mM MTSES. Die waagerechte blaue Linie markiert 100 % Strom.

Neben der MTSES-Reaktivität wurde auch das Schaltverhalten der 5 Einzelmutanten und die der Kombinationsmutante $\Delta\text{N}/\text{C723S}$ verglichen (A-9 bis A-12). Die stärksten Abweichungen in Bezug auf die Aktivierungs- und Deaktivierungseigenschaften zeigte dabei C723S. Diese Mutante wies eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Bild 3.24 A) sowie eine starke Verringerung von τ_{akt} (83.1 ± 23.2 ms, WT: 201.9 ± 13.5 ms) auf. Zudem war die Deaktivierung von C723S beschleunigt (Bild 3.24 B).

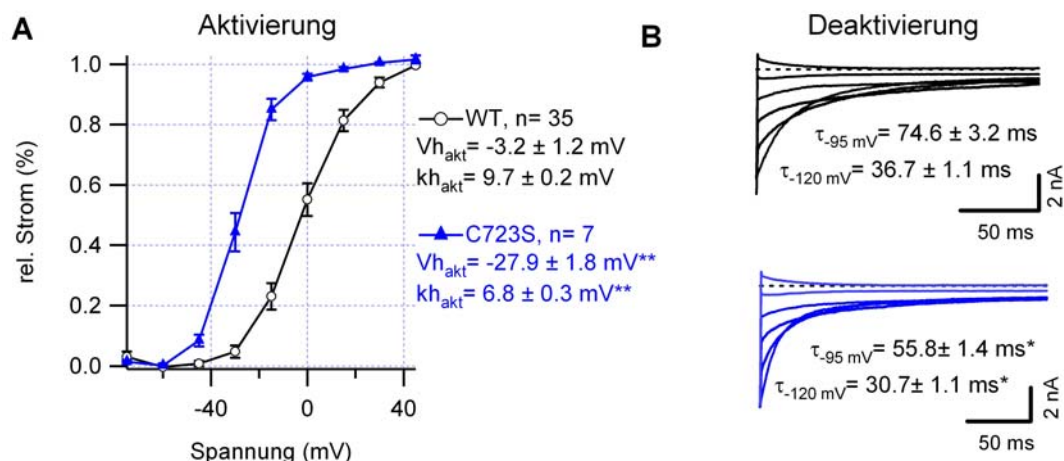


Bild 3.24: Modifikationen des Schaltverhaltens von C723S

(A) Relative Offenwahrscheinlichkeit des WT im Vergleich zu C723S. (B) Repräsentative Stromspuren des WT (schwarz) und C723S (blau) für den Verlauf der Deaktivierungskinetik bei verschiedenen Spannungen. Die Linien für die Stromspuren für -95 mV und -120 mV sind verstärkt. Die angegebenen τ_{deakt} -Werte entsprechen den Mittelwerten des WT (n= 26-29) und C723S (n= 5). (**P<0.005/WT, *P<0.05/WT)

Eine Substitution von C723S durch Serin führte zu Kanälen, die früher öffnen und schneller deaktivieren und damit zu den gleichen Modifikationen des Schaltverhaltens, welche wir bei einer Behandlung des WT mit MTSES beobachten konnten (siehe Tabelle 3.2). Deshalb denken wir, dass C723 eine der AS ist, über die hERG durch ROS moduliert wird. Interessanterweise zeigte C723S auch im ΔN -Hintergrund (ΔN /C723S) eine in Richtung negative Spannung verschobene Aktivierung, erzeugte aber keine weitere Beschleunigung der Deaktivierung (A-10). Die Substitutionsmutanten C740S, C750S und C828S zeigten gegenüber dem WT eine verlangsamte Inaktivierungskinetik. Möglicherweise werden diese AS auch durch MTSES modifiziert und tragen zu der bei MTSES-Applikation beobachteten Verlangsamung der Inaktivierung bei.

Im weiteren Verlauf wurde die reduzierte MTSES-Sensitivität des N-Terminus untersucht. Es wurden alle Cys in diesem Bereich durch Serin substituiert (Bild 3.25 A). Die 9 Substitutionsmutanten generierten einen hERG-ähnlichen Strom und zeigten keine reduzierte MTSES-Sensitivität gegenüber dem WT. Erst die Kombination aller 10 substituierten N-terminalen Cys (10Cys) führte zu einem weniger sensitiven Kanal (Bild 3.25 B).

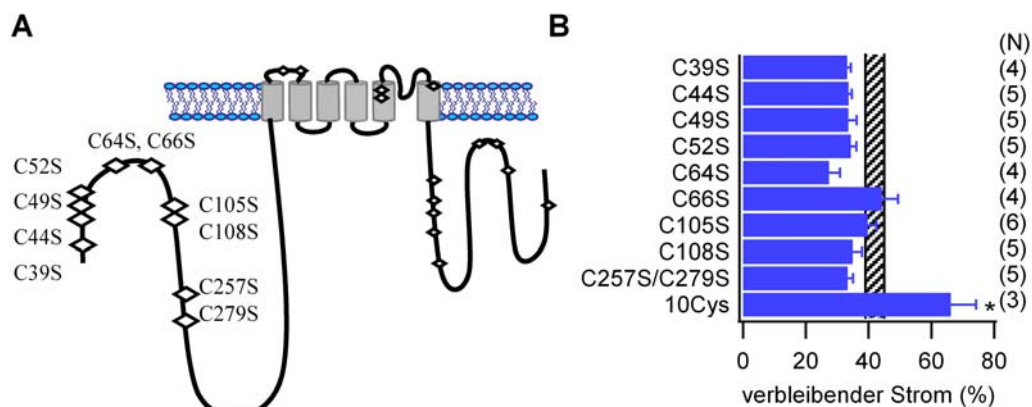


Bild 3.25: Sensitivität der N-terminalen Cys-Mutanten gegenüber 1 mM MTSES

(A) Cys im N-Terminus. (B) Der verbleibende Strom ($I_{200} \times 100\%$) jeder Kanalmutante wurde als blauer Balken \pm SEM dargestellt. (C39S: $I_{200} = 0.33 \pm 0.01$, C44S: $I_{200} = 0.34 \pm 0.01$, C49S: $I_{200} = 0.33 \pm 0.03$, C52S: $I_{200} = 0.34 \pm 0.02$, C64S: $I_{200} = 0.24 \pm 0.03$, C66S: $I_{200} = 0.44 \pm 0.05$, C105S: $I_{200} = 0.40 \pm 0.03$, C108S: $I_{200} = 0.34 \pm 0.03$, C257S/C279S: $I_{200} = 0.33 \pm 0.02$), 10Cys: $I_{200} = 0.66 \pm 0.08$. Die schraffierte Fläche entspricht der Kontrolle hERG-WT mit $I_{200} = 0.42 \pm 0.03$. (N) gibt die Anzahl gemessener Zellen an. (* $P < 0.05$ /WT)

Die reduzierte MTSES-Sensitivität von 10Cys ($I_{200} = 0.66 \pm 0.08$) und ΔN ($I_{200} = 0.70 \pm 0.03$) könnte entweder durch eine kumulative Reaktion mehrerer N-terminaler Cys generiert werden und/oder auf einer Modifikation des Schaltverhaltens beruhen. Sowohl ΔN als auch 10Cys und C723S weisen eine gegenüber dem WT beschleunigte Deaktivierung auf. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Deaktivierungsgeschwindigkeit und MTSES-Sensitivität zu prüfen, wurde die Kanalmutante hERG- $\Delta(2-15)$ erzeugt. Generell wird angenommen, dass in hERG die AS 2-9 eine Struktur ausbilden, welche mit anderen Kanalstrukturen interagiert und so zu der langsamen Deaktivierung im WT führt (Wang *et al.*, 1998). Diese Interaktion kann sowohl im ΔN als auch in $\Delta(2-15)$ nicht mehr stattfinden. hERG- $\Delta(2-15)$ besitzt also eine ΔN -ähnliche Deaktivierungseigenschaften (A-17), enthält jedoch noch alle Cys des N-Terminus. Es zeigte sich, dass die MTSES-Sensitivität von $\Delta(2-15)$ tatsächlich viel schwächer als im WT war. Durch Kombination von $\Delta(2-15)$ mit C723S generierten wir die nahezu MTSES-unsensitive Kanalmutante $\Delta(2-15)/C723S$ (Bild 3.26).

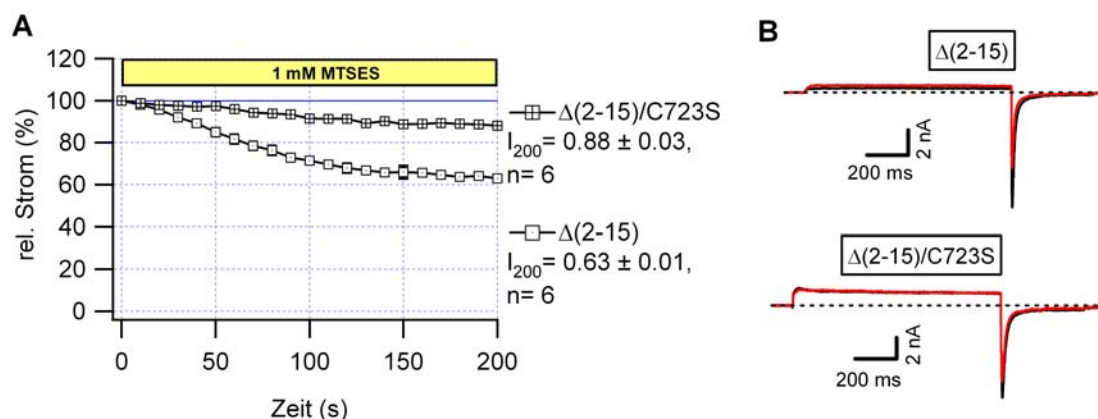


Bild 3.26: MTSES-Sensitivität der Kanalmutanten $\Delta(2-15)$ und $\Delta(2-15)/C723S$

(A) MTSES-induzierte Stromreduktion von hERG- $\Delta(2-15)$ und hERG- $\Delta(2-15)/C723S$. Die waagerechte blaue Linie markiert 100 % Strom. (B) Repräsentative Stromspuren für $\Delta(2-15)$ und $\Delta(2-15)/C723S$ jeweils vor (schwarze Spur) und 200 s nach Beginn der Stromreduktion durch MTSES (rote Spur).

Sowohl eine Kombination aller N-terminalen Cys als auch die Deletion der für das Deaktivierungsverhalten relevanten Bereiche führte zu Kanälen, die deutlich weniger sensitiv gegenüber MTSES sind. Diese über den N-Terminus vermittelte MTSES-Sensitivität beruht demnach auf einer inter- und/oder intra-molekularen Interaktion, in die mehrere Cys sowie die ersten 9 AS des N-Terminus involviert sind. Zusätzlich beruht ein Teil der MTSES-Sensitivität von hERG auf dem Cys 723.

3.7 Zusammenhang MTSES-Reaktivität und Schaltverhalten

3.7.1 Deaktivierung

Die durch MTSES und MTSEA induzierte Stromreduktion an hERG war mit einer Beschleunigung der Deaktivierung verbunden. Im Vergleich dazu traten sowohl bei der Behandlung von hERG mit DTNB als auch bei einer Applikation von MTSES an endogenen Kanälen nur geringe Veränderungen der Deaktivierungskinetik auf. Infolgedessen wurde ein Zusammenhang zwischen der durch MTS-Substanzen hervorgerufenen Stromreduktion und der Deaktivierungsbeschleunigung vermutet. Um nur die Veränderungen der Deaktivierungskinetik während der Stromreduktion zu betrachten, wurde der Quotient τ_0/τ_{200} verwendet. Für die Applikation von MTSES an hERG in HEK293-Zellen betrug $\tau_0/\tau_{200} = 3.4 \pm 0.2$. Demnach wird durch 1 mM MTSES die Deaktivierungsgeschwindigkeit transienter Kanäle um das 3.4-fache erhöht und die Stromamplitude um circa 70 bis 80 % reduziert ($I_{200} = 0.25 \pm 0.02$, $n = 6$) (Bild 3.27 D, E). Die Deaktivierung endogener hERG-Ströme hingegen ist von vornherein beschleunigt (SH-SY5Y: $\tau_{\text{deakt}}(-120 \text{ mV}) = 19.3 \pm 0.9 \text{ ms}$, $n = 6$, HEK293: $\tau_{\text{deakt}}(-120 \text{ mV}) = 36.7 \pm 1.1 \text{ ms}$, $n = 26-29$). Möglicherweise kann die MTSES-induzierte Deaktivierungsbeschleunigung an

diesen Kanälen nur reduziert ($\tau_0/\tau_{200} = 1.83 \pm 0.18$) stattfinden und dies führt zu einer verringerten MTSES-Stromreduktion ($I_{200} = 0.53 \pm 0.02$). Je kleiner der Quotient (τ_0/τ_{200}) war, desto geringer war auch die Stromreduktion durch die jeweilige Substanz (Bild 3.27 D, E). DTNB führt an hERG zu einer deutlich schwächeren Stromreduktion und zu keiner Veränderung der Deaktivierungskinetik ($\tau_0/\tau_{200} = 1.22 \pm 0.07$). Daher vermuten wir, dass ein Teil der MTS-Sensitivität von hERG durch eine Beschleunigung der Deaktivierung generiert wird.

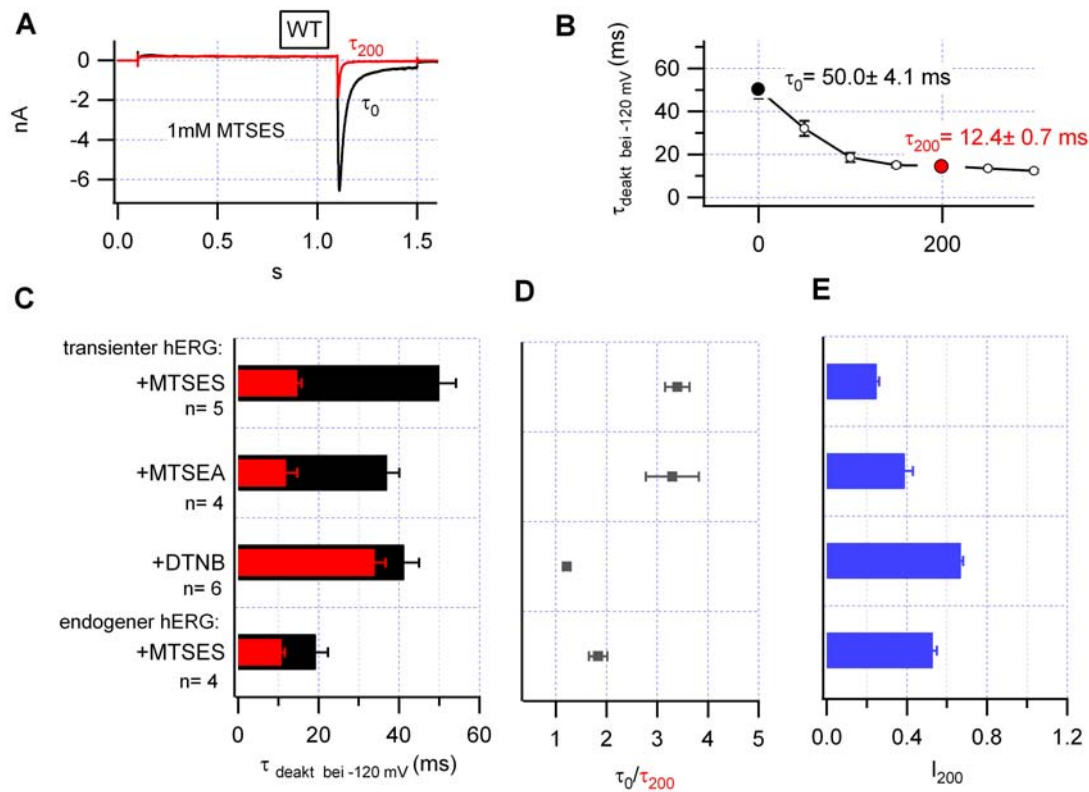


Bild 3.27: Veränderung der Deaktivierungsgeschwindigkeit von hERG durch 1 mM Cys-modifizierende Substanzen in Zusammenhang mit der Stromreduktion

(A) Zelle mit Stromspur des -120 mV Pulses zum Zeitpunkt 0 (schwarze Spur) und 200 s nach Beginn der Stromreduktion durch MTSES (rote Spur). (B) Veränderung der Deaktivierungszeitkonstanten für hERG in HEK293-Zellen bei MTSES-Behandlung mit den Werten für τ_0 und τ_{200} . Der Zeitpunkt 0 entspricht dabei dem letzten Puls vor Beginn der Stromreduktion. (C) Darstellung von τ_0 (schwarzer Balken) und τ_{200} (roter Balken) von hERG in Abhängigkeit von der Art der Cys-modifizierenden Substanz. (D) Entsprechend der Skalierung in (C) wird hier der Quotient aus (τ_0/τ_{200}) dargestellt. (E) Entsprechend der Skalierung in (C) sind die dazugehörigen I_{200} -Werte dargestellt (blaue Balken). Dabei würde $I_{200} = 1$ dem Fall entsprechen, dass es zu keiner Stromreduktion kommt. An hERG in HEK293-Zellen findet bei Applikation von 1 mM MTSES die stärkste Stromreduktion statt ($I_{200} = 0.25 \pm 0.02$, n=6).

Diese Vorstellung wurde bestätigt, als für alle Cys-Substitutionsmutanten ein Zusammenhang zwischen der MTSES-induzierten Deaktivierungsbeschleunigung und der Stromreduktion hergestellt werden konnte (Bild 3.28). Zur Beschreibung der Deaktivierungsbeschleunigung wurde wieder der Quotient τ_0/τ_{200} verwendet. Für alle Kontrollmessungen

des WT lagen die Werte dieses Quotienten zwischen $\tau_0/\tau_{200}=4.4 \pm 0.4$, $n=8$ und $\tau_0/\tau_{200}=2.9 \pm 0.15$, $n=5$. Die Stärke der Stromreduktion wurde mit dem Parameter ΔI_{200} beschrieben.

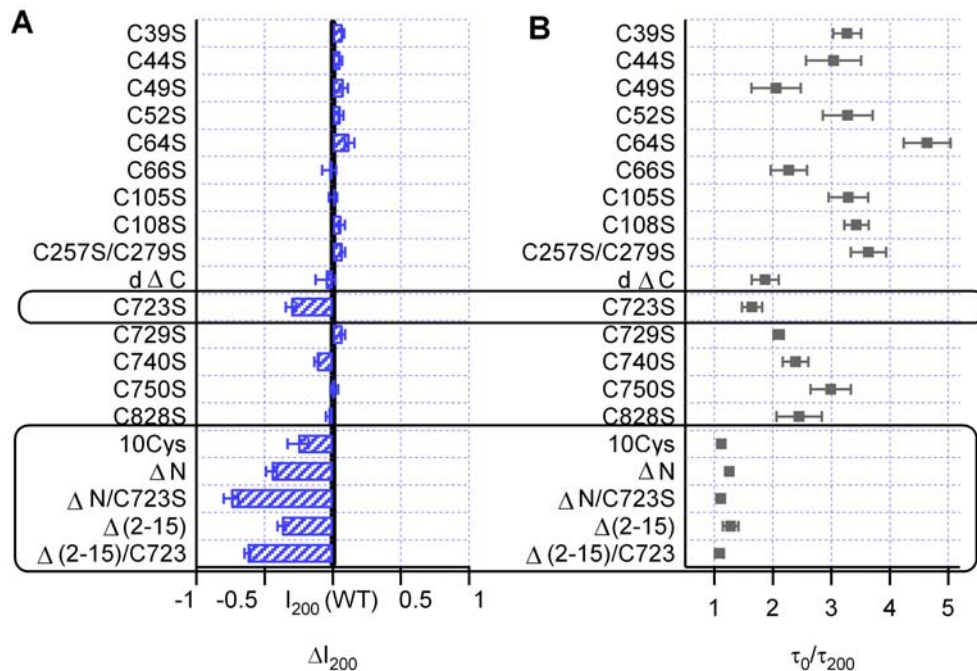


Bild 3.28: Zusammenhang MTSES-Sensitivität und Deaktivierungsbeschleunigung

(A) Der Parameter $\Delta I_{200} \pm \text{SEM}$ wurde für jede Kanalmutante in Bezug zum Mittelwert der jeweiligen WT-Kontrolle ermittelt ($\Delta I_{200} = I_{200}^{\text{WT}} - I_{200}^{\text{Mutante}}$). Die zwei Rahmen kennzeichnen Kanalmutanten, deren I_{200} -Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ (10Cys) beziehungsweise $P < 0.005$ (ΔN , $\Delta N/C723S$, $\Delta(2-15)$, $\Delta(2-15)/C723S$) gleich dem WT sind. Diese Werte sind demnach signifikant verschieden vom WT und zeigen, dass diese Kanalmutanten partiell oder vollständig unsensitiv gegenüber MTSES sind. (B) Der Quotient τ_0/τ_{200} beschreibt die Veränderung der Deaktivierungsgeschwindigkeit nach der Applikation von 1 mM MTSES. Ist dieser Wert < 1 liegt eine Verlangsamung, ist er > 1 eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik vor.

Alle Kanalmutanten, die eine WT-ähnliche MTSES-Sensitivität aufwiesen ($\Delta I_{200}=0$), zeigten eine Beschleunigung ihrer Deaktivierung ($\tau_0/\tau_{200}>1$). Die im unteren Teil von Bild 3.28 umrahmten 5 Kanalmutanten wiesen eine partielle beziehungsweise vollständige Unsensitivität gegenüber MTSES auf. Die Deaktivierung dieser Kanäle wurde durch MTSES nicht weiter beschleunigt. Wir nehmen an, dass die von vornherein beschleunigte Deaktivierung dieser 5 Kanalmutanten (A-10) durch MTSES nicht noch weiter beschleunigt werden kann.

Daneben weisen aber auch C723S, C729S und dΔC eine von vornherein gegenüber dem WT beschleunigte Deaktivierung (A-6, A-10) auf, die durch MTSES noch weiter beschleunigt wird (C723S1: $\tau_0/\tau_{200}=1.6 \pm 0.2$, C729S: $\tau_0/\tau_{200}=2.1 \pm 0.1$, dΔC: $\tau_0/\tau_{200}=1.8 \pm 0.2$). Die MTSES-Sensitivität von C723S ist reduziert ($I_{200}=0.61 \pm 0.03$, WT: $I_{200}=0.29 \pm 0.01$), die der Kanalmutanten C729S und dΔC

hingegen nicht. Wir vermuten, dass es noch einen zweiten, vom Deaktivierungsverhalten der Kanäle unabhängigen, Mechanismus gibt, über den MTSES die Stromreduktion an hERG bewirkt.

Unsere Arbeit hat gezeigt, dass einer der MTSES-Effekte an hERG in einer Beschleunigung der Deaktivierung besteht und dass diese zur Reduktion des Stromes beiträgt. Vermutlich wird diese Beschleunigung durch eine Modifikation mehrerer N-terminaler Cys und der damit induzierten oder verhinderten Interaktion des N-Terminus hervorgerufen.

3.7.2 Inaktivierung

Es wurde für die Kanalmutanten M645L und S620T nachgewiesen, dass deren stärkere beziehungsweise schwächere Inaktivierungseigenschaften zu einer gegenüber dem WT verstärkten beziehungsweise abgeschwächten ChT-Sensitivität führten. Im Folgenden haben wir untersucht, ob dieser Zusammenhang auch für die Stromreduktion durch MTSES gilt (Bild 3.29).

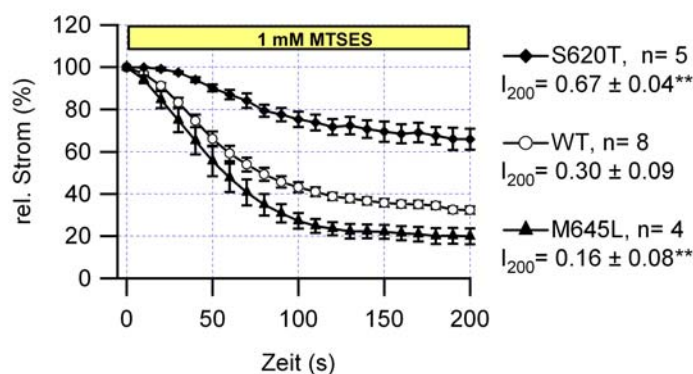


Bild 3.29: MTSES-induzierte Stromreduktion der Inaktivierungsmutanten M645L und S620T

Die MTSES-Sensitivität wurde für hERG-M645L und WT an den Einwärtsströmen und für hERG-S620T an den Auswärtsströmen bestimmt. (** $P < 0.005/\text{WT}$)

Es zeigte sich, dass die Inaktivierungsmutante M645L eine stärkere und S620T eine geringere MTSES-Stromreduktion aufwies als der WT. Die durch diese Inaktivierungsmutanten hervorgerufenen Konformationsänderungen haben demnach auf die MTSES- und ChT-Sensitivität von hERG die gleiche Wirkung. Die Kanalmutante M645L wies neben der sehr schnellen Inaktivierung auch eine verlangsamte Deaktivierung auf (M645L: τ_{deakt} bei $-120 \text{ mV} = 54.3 \pm 3.5 \text{ ms}$, WT: τ_{deakt} bei $-120 \text{ mV} = 36.7 \pm 1.1 \text{ ms}$). Diese verlangsamte Deaktivierung wurde in ähnlichem Maße durch MTSES beschleunigt ($\tau_0/\tau_{200} = 5.0 \pm 0.4$, $n = 6$) wie die des entsprechenden WT ($\tau_0/\tau_{200} = 4.4 \pm 0.4$, $n = 8$).

3.8 Rolle der Methionine bei der Modifikation von hERG durch ChT im partiell oder vollständig MTSES-unsensitiven Kanal

Da ChT sowohl Met als auch Cys oxidiert, ist anzunehmen, dass eine Überlappung beider Effekte die Identifizierung der in hERG durch ChT modifizierten Met erschwerte. ChT führte am Reststrom MTSES behandelter WT-Zellen zu keinem weiteren Stromverlust (Bild 3.19). Dies führen wir auf die circa 25 % der Kanäle zurück, die sowohl nach ChT-, als auch nach einer MTSES-Behandlung weiterhin Strom generieren. Wenn der nach der MTSES-Behandlung verbleibende Reststrom jedoch größer war als beim WT, so wie bei ΔN , dann führte ChT auch zu einer weiteren Stromreduktion (Daten nicht gezeigt). Wir vermuteten daher, dass an der Stromreduktion durch ChT mehr AS beteiligt sind als an der Stromreduktion durch MTSES. Dies wurde bestätigt, als die ChT-Sensitivität der C-terminalen Cys und der MTSES-unsensitiven Mutante $\Delta N/C723S$ untersucht wurde (Bild 3.30).

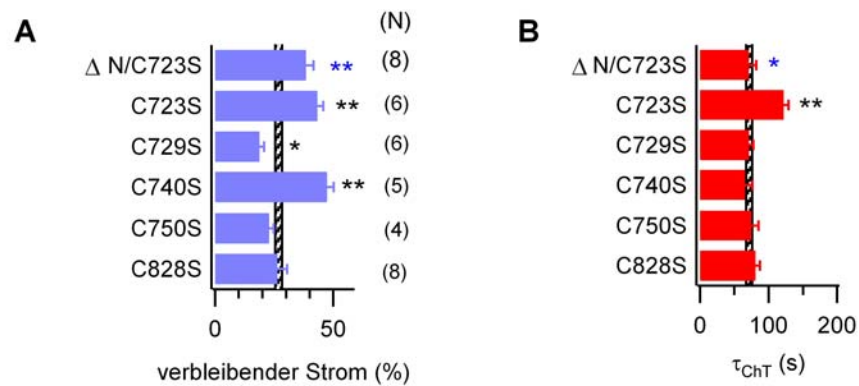


Bild 3.30: ChT-Sensitivität des MTSES-unsensitiven Kanals $\Delta N/C723S$ und der 5 C-terminalen Cys

(A) Für jede Kanalmutante wurde der prozentual verbleibende Strom ($I_{200} \times 100\%$) als blauer Balken \pm SEM dargestellt. Die schraffierte Fläche entspricht dem verbleibenden Strom des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$. Der I_{200} -Wert für ΔN ist 0.19 ± 0.03 . ($\Delta N/C723S$: $I_{200} = 0.38 \pm 0.03$, C723S: $I_{200} = 0.43 \pm 0.02$, C729S: $I_{200} = 0.18 \pm 0.02$, C740S: $I_{200} = 0.47 \pm 0.02$, C750S: $I_{200} = 0.22 \pm 0.02$, C828S: $I_{200} = 0.26 \pm 0.04$). (B) Die Zeitkonstante (τ_{ChT}) wurde für jede Mutante als roter Balken \pm SEM abgebildet. Die schraffierte Fläche entspricht dabei der Zeitkonstanten des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$. Der τ_{ChT} -Wert für ΔN ist 37.5 ± 4.1 s. ($\Delta N/C723S$: $\tau_{ChT} = 71.1 \pm 11.0$ s, C723S: $\tau_{ChT} = 121.9 \pm 6.9$ s, C729S: $\tau_{ChT} = 71.7 \pm 6.4$ s, C740S: $\tau_{ChT} = 65.5 \pm 10.6$ s, C750S: $\tau_{ChT} = 75.1 \pm 10.1$ s, C828S: $\tau_{ChT} = 80.8 \pm 6.4$ s). (N) gibt jeweils die Anzahl gemessener Zellen an. (* $P < 0.05/WT$, ** $P < 0.005/WT$, * $P < 0.05/\Delta N$, ** $P < 0.005/\Delta N$)

Hierbei zeigte sich, dass auch C723 und C740 zur Stromreduktion durch ChT beitragen. Die Substitution von C723 durch Serin führte sowohl im WT- als auch im ΔN -Hintergrund zu einer Reduktion der ChT-Sensitivität von hERG. Ob die bei C723S und $\Delta N/C723S$ verbleibende ChT-Sensitivität über die drei identifizierten Met vermittelt wird, haben wir anschließend geprüft (Bild 3.31).

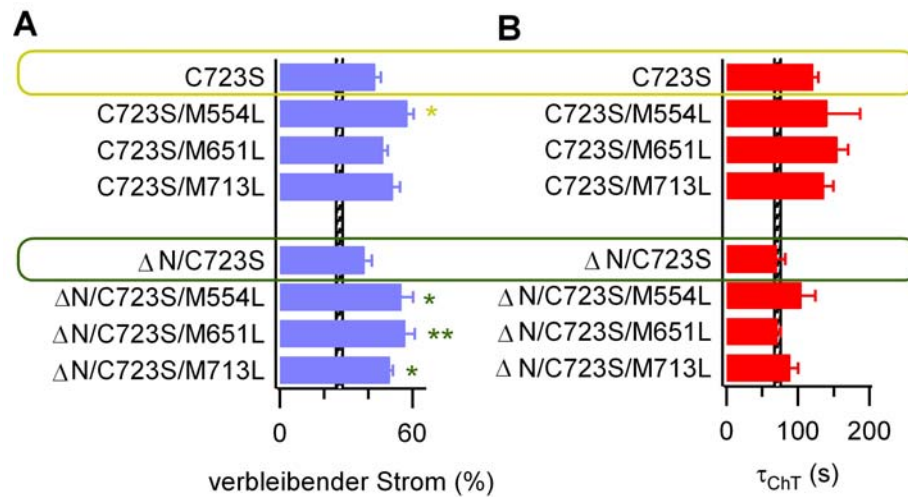


Bild 3.31: ChT-Sensitivität der Met-Mutanten im C723S beziehungsweise ΔN/C723S Hintergrund (A) Für jede Kanalmutante wurde der prozentual verbleibende Strom ($I_{200} \times 100\%$) als blauer Balken \pm SEM dargestellt. Die schraffierte Fläche entspricht dem verbleibenden Strom des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$ (C723S in Kombination mit: M554L: $I_{200} = 0.57 \pm 0.03$, M651L: $I_{200} = 0.46 \pm 0.02$ oder M713L: $I_{200} = 0.51 \pm 0.03$ sowie ΔN/C723S in Kombination mit: M554L: $I_{200} = 0.55 \pm 0.05$, M651L: $I_{200} = 0.57 \pm 0.04$ oder M713L: $I_{200} = 0.50 \pm 0.04$). (B) Die Zeitkonstante (τ_{ChT}) wurde für jede Kanalmutante als roter Balken \pm SEM abgebildet, wobei die schraffierte Fläche der Zeitkonstanten des $WT_{(Mittel)} \pm SEM_{(Mittel)}$ entspricht (C723S in Kombination mit M554L: $\tau_{ChT} = 141.3 \pm 45.6$ s, M651L: $\tau_{ChT} = 155.4 \pm 14.7$ s oder M713L: $\tau_{ChT} = 136.8 \pm 12.8$ s sowie ΔN/C723S in Kombination mit M554L: $\tau_{ChT} = 105.3 \pm 19.2$ s, M651L: $\tau_{ChT} = 71.4 \pm 9.4$ s oder M713L: $\tau_{ChT} = 89.4 \pm 10.7$ s.). (N) gibt jeweils die Anzahl gemessener Zellen an. (* $P < 0.05$ /C723S, * $P < 0.05$ /ΔN/C723S, ** $P < 0.005$ /ΔN/C723S)

Es wurden M554L, M651L und M713L jeweils einzeln mit den Kanalmutanten C723S und ΔN/C723S kombiniert. Diese 6 Cys/Met-Kombinationsmutanten wurden biophysikalisch charakterisiert (A-13 bis A-16) und ihre ChT-Sensitivität untersucht. M554L führte sowohl im C723S- als auch im ΔN/C723S-Hintergrund zu einem mit $P < 0.05$ signifikanten Anstieg von I_{200} . Eine Kombination von M651L oder M713L mit ΔN/C723S führte im ΔN/C723S-Hintergrund zu mehr verbleibendem Strom nach ChT-Behandlung. Die Frage, ob die Kombination von 3Met, C723S und C740S zu einem vollständig ChT-unsensitiven hERG-Kanal führen würde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

4 Diskussion

Viele der mit Ischämie/Reperfusion, kongestivem Herzfehler oder diabetischer Kardiomyopathie einhergehenden pathologischen Ereignisse sind mit einer verstärkten Bildung von ROS verbunden (Wold *et al.*, 2005) (Bild 4.1). In kardialen Myozyten führt oxidativer Stress zu Veränderungen der Aktionspotentialamplitude und der Aktionspotentialdauer (APD). Dabei tragen verschiedene Mechanismen zu den Änderungen der Membranpermeabilität bei, darunter auch eine oxidative Modifikation von Kaliumkanälen (Carmeliet, 1999). Da hERG maßgeblich an der Repolarisierung des kardialen AP beteiligt ist, kommt diesem Kanal eine besondere Rolle bei der Ausprägung der APD zu. Eine unbeabsichtigte pharmakologische Inhibierung dieses Kanals kann zum *long-QT-Syndrom* (LQTS) und damit zu letalen Arrhythmien führen. Die gleichen Folgen würde eine ROS-induzierte Inhibierung von hERG haben. Am Modell des diabetischen Kaninchens (Typ I) wurde beispielsweise gezeigt, dass eine ROS-induzierte Reduktion des I_{Kr} -Stromes die Hauptursache für die Ausbildung des LQTS bei Diabetikern ist (Zhang *et al.*, 2006). Das LQTS wird bei 25 % aller Diabetiker (Typ I und Typ II) diagnostiziert und führt in dieser Patientengruppe zu einer gesteigerten Mortalitätsrate (Veglio *et al.*, 2004). Auch die Verlängerung der APD, zu der es nach einer Herzischämie kommen kann (Carmeliet, 1999), könnte durch eine Inhibierung der hERG-Kanäle durch ROS hervorgerufen werden.

4.1 ROS und ROS-induzierende Substanzen modifizieren hERG

Bisher wurden für die Wirkung von endogenen ROS an hERG-Strömen sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte beschrieben (Bild 4.1). Demnach haben ROS unterschiedliche Effekte auf die Schalteigenschaften und Leitfähigkeit des Kanals. Extern appliziertes H_2O_2 führt zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung (V_{h_akt}) hin zu negativeren Potentialen und zu einer Beschleunigung der Deaktivierung. Als resultierender Gesamteffekt führt H_2O_2 sowohl an heterolog exprimierten als auch an nativen hERG-Kanälen zu einer Zunahme der Stromamplitude (Han *et al.*, 2004). Hingegen wurde für die Wirkung von extern über das Xanthin/Xanthin Oxidase-System (X/XO) generierten Superoxidanionen eine Reduktion der Stromamplitude von hERG in HEK293-Zellen gezeigt (Zhang *et al.*, 2003).

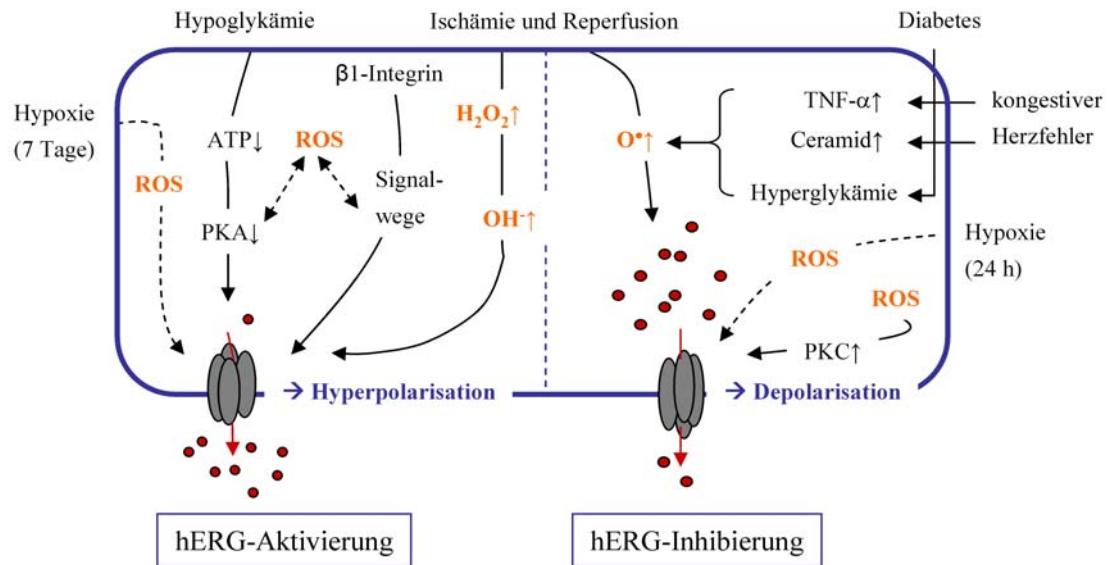


Bild 4.1: Wirkung endogener ROS an hERG

Während einer Ischämie werden trotz Sauerstoffunterversorgung H_2O_2 und Superoxidanionen gebildet (Becker *et al.*, 1999, Nohl, 1987). Während der nachfolgenden Reperfusion steigt der Gehalt an H_2O_2 und Hydroxylradikalen (Vanden Hoek *et al.*, 1997). Bei Patienten mit kongestivem Herzfehler oder Diabetes führen Ceramide, TNF- α und/oder Hyperglykämie zu einem Anstieg der Superoxidanionenkonzentration. Abgesehen von den akuten Effekten von ROS an hERG modulieren ROS den Kanal auch auf der Ebene der Translation (Nanduri *et al.*, 2008). Eine Modulation der hERG-Ströme durch ROS wurde auch als möglicher Mechanismus für die Wirkung von β_1 -Integrinen, Proteinkinase C (PKC) und chronischer Hypoxie am Kanal diskutiert (Cherubini *et al.*, 2005, Gopalakrishna *et al.*, 1997, Fontana *et al.*, 2001). ROS fördern die Aktivität der PKC und der β -adrenergen Signalwege im Herzen (Ward und Moffat, 1995, Barros *et al.*, 1998) und können über diesen Weg zur Reduktion der hERG-Ströme führen.

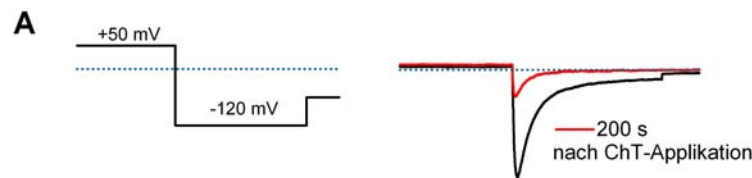
Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte oxidierender Substanzen an hERG zu charakterisieren und die Reste zu identifizieren, auf deren Modifikation diese Effekte beruhen. Eine Aufklärung der molekularen Grundlagen soll uns helfen, die Mechanismen einer oxidativen Modulation von hERG zu verstehen. Der Fokus lag dabei auf der Modifikation schwefelhaltiger Aminosäuren (AS), da nur für diese zelluläre Schutzsysteme bekannt sind (Bild 1.1). Eine Modulation des Kanals im Sinne einer Redoxregulation wäre darum nur über Met und Cys möglich. Zur Simulation der Wirkung endogener ROS am Kanalprotein wurden die Met- und Cys-modifizierende Substanz ChT sowie die nur Cys-modifizierende Substanz MTSES verwendet. Beide Substanzen bewirkten die gleichen Veränderungen der Schalteigenschaften, wie sie auch für die Wirkung von endogenen ROS beschrieben wurden. Sowohl ChT als auch MTSES führten zu einer Reduktion der Stromamplitude und zur Beschleunigung der Deaktivierung. Die Cys-modifizierende Substanz MTSES bewirkte zudem eine deutliche Verschiebung von V_{h_akt} hin zu negativeren Potentialen. Deshalb halten wir ChT und MTSES für geeignete Substanzen, um die Wirkung von ROS an hERG zu untersuchen. Die Effekte dieser Substanzen am Kanal waren vielfältig, so dass vermutlich Modifikationen mehrerer Reste zu deren Ausbildung beitragen.

4.2 ChT als modifizierende Substanz

4.2.1 Effekte von ChT am hERG-Kanal

In unseren Experimenten führte ChT an hERG zur Reduktion der Stromamplitude sowie zu leichten Veränderungen des Schaltverhaltens. Es wurde die Deaktivierung beschleunigt und V_{h_inakt} hin zu positiveren Potentialen verschoben (Bild 4.2).

ChT-induzierte Stromreduktion:



ChT-induzierte Veränderungen der Schalteigenschaften:

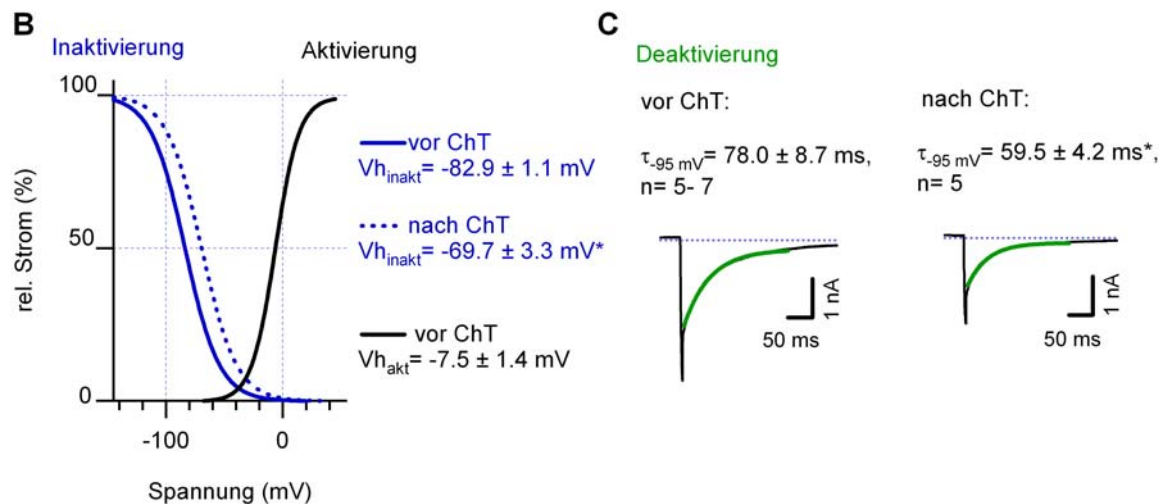


Bild 4.2: ChT-Effekte am hERG-Kanal

(A) ChT induzierte eine 70 bis 78 %-ige Stromreduktion an hERG. (B) Darstellung der relativen Inaktivierungswahrscheinlichkeit für 3 bis 7 Zellen (siehe Tabelle 3.1), jeweils vor (blaue, durchgezogene Linie) und nach ChT-Applikation (blaue, gepunktete Linie). Zur besseren Übersicht wurden hier nur die Anpassungen der Datenpunkte mit der Boltzmann-Gleichung dargestellt. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (schwarze Linie) erfährt durch ChT keine Modifikation. Der Bereich, den beide Kurven überschneiden, entspricht dem Spannungsbereich, in dem im Gleichgewicht Strom generiert wird (*window current*). (C) Repräsentative Stromspuren für die Beschleunigung der Deaktivierung durch ChT. Die Werte für $\tau_{-95\text{ mV}}$ sind hier für vor und nach ChT-Applikation angegeben. (* $P < 0.05/\text{WT}$) (Die Werte für τ_{deakt} bei -120 mV und -145 mV sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.)

Zu abweichenden Ergebnissen führte eine von unseren Kooperationspartnern durchgeführte Charakterisierung des Schaltverhaltens ChT-behandelter Kanäle. Die Gruppe von Su *et al.* (2007) beschreibt neben der Beschleunigung der Deaktivierung auch eine Verlangsamung der Aktivierungskinetik und keine Veränderungen der Inaktivierungseigenschaften. Im Unterschied zu unseren Messungen wurde hier mit zusätzlich Glukose- und MgATP-enthaltenden Lösungen sowie bei einer Messtemperatur von 37 °C gearbeitet. Für hERG-Messungen ohne Glukose und ATP wurde eine nach 10 min einsetzende stetige

leichte Abnahme des Stromes, der so genannte *rundown*, mit Veränderungen des V_{h_akt} -Parameters beschrieben (Zhang *et al.*, 2003). Diesen *rundown* haben wir nur an Zellen mit sehr viel hERG-Strom (>20 nA) beobachtet. Da zur Datenauswertung nur Zellen mit geringerer Stromamplitude verwendet wurden, nehmen wir an, dass vor allem der Unterschied in der Messtemperatur zu den abweichenden Ergebnissen beiträgt. Ein Anstieg der Messtemperatur von 23 °C auf 35 °C führt zur Beschleunigung der gesamten hERG-Kinetik sowie zu Veränderungen der pharmakologischen Eigenschaften des Kanals (Zhou *et al.*, 1998).

Beide Arbeiten zeigen, dass ChT eine Reduktion der Stromamplitude und eine Beschleunigung der Deaktivierung induziert. Die diesen Effekten zugrunde liegenden Mechanismen können daher auch bei einer Messtemperatur von 20 °C untersucht werden.

4.2.2 Wirkungsmechanismus von ChT in der Zelle

Bei der Dissoziation von ChT entstehen Dichloramin, p-Tsa und HOCl/OCl⁻ je nach pH-Wert zu unterschiedlichen Anteilen (Bishop und Jennings, 1958). HOCl kann neben Disulfiden auch die Bildung von Met-Sulfoxiden, Sulfin- und Sulfonsäuren oder Chloraminen in der Zelle hervorrufen (Schraufstatter *et al.*, 1990, Carr und Winterbourn, 1997). Chloramine sind wiederum als stabile Generatoren von Singulett-sauerstoff (Stief *et al.*, 2003) bekannt. In der Arbeit von Schiemann und Novak (1972) wird die oxidierende Wirkung von ChT ausschließlich auf die Bildung von HOCl zurückgeführt. Welcher dieser Prozesse letztendlich in einem bestimmten Membranbereich abläuft und zu welcher Proteinmodifikation führt, könnte durch mehrere Faktoren determiniert sein. Vermutlich hängt das unter anderem vom vorherrschenden pH-Wert, dem Gehalt an Metallionen, vom endogenen ROS-Gehalt und dem Anteil reduktiver Kapazitäten in der Zelle ab. Denkbar ist, dass ChT-induzierte Modifikationen an schwefelhaltigen AS über Superoxidanionen oder HOCl generiert werden.

4.2.3 ChT als Met-oxidierende Substanz

Nach Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer Akkumulation neutrophiler Granulozyten in den betroffenen Myokardarealen (Engler *et al.*, 1986). Diese Zellen setzen Hypochlorid (HOCl) frei, das mit anderen AS zu organischen Chloraminen reagiert (Weiss *et al.*, 1982). Chloramine könnten daher im ischämischen Herzen an einer Inhibierung des Kanals und der damit verbundenen Modifikation des AP beteiligt sein. Wir wählten ChT als Oxidationsmittel, weil es, wie die organischen Chloramine auch, nur schwefelhaltige AS modifiziert (Shechter *et al.*, 1975, Peskin und Winterbourn, 2001).

Wir identifizierten drei Met, deren gemeinsame Oxidation partiell zur Stromreduktion durch ChT beiträgt. Darüber hinaus beruht die ChT-induzierte Stromreduktion auf der Modifikation zweier Cys und wahrscheinlich noch auf weiteren bisher ungeklärten Mechanismen. Da eine spezifische Identifizierung oxidationssensitiver Met nur in

SH-freien Proteinen möglich ist (Shechter *et al.*, 1975), war ChT für unsere Zwecke nur bedingt geeignet. In welchem Ausmaß Met-Oxidationen an der Stromreduktion durch ChT beteiligt sind, kann demnach nur mit einem Cys-freien Kanal geklärt werden. Wir vermuteten jedoch, dass ein vollständig Cys-freier hERG-Kanal nicht funktionell sein würde. Es ist bekannt, dass eine gleichzeitige Substitution der Cys an den Positionen 445, 449, 555, 566 und 634 durch Alanin zum Funktionsverlust von hERG führt (Jiang *et al.*, 2005). Werden diese fünf Cys jedoch einzeln substituiert, beeinflusst das die Kanalfunktion nicht negativ (Jiang *et al.*, 2005, Fernandez *et al.*, 2005). Eine Rolle dieser fünf Cys bei der von uns untersuchten MTS-induzierten Stromreduktion hatten wir im Rahmen unserer Arbeit ausgeschlossen (Kapitel 3.6).

Der Einsatz anderer oxidierender Substanzen wie Periodat oder N-Chlorosuccinimid statt ChT war nicht sinnvoll, da diese eine noch geringere Spezifität für Met aufweisen (zur Übersicht: Shechter *et al.*, 1975). Bisher sind uns nicht alle Determinanten der ChT-induzierten Stromreduktion bekannt. Deshalb können wir nicht ausschließen, dass indirekte Oxidationen nichtschwefelhaltiger AS, Oxidationen hERG-assoziiierter Proteine oder eine Peroxidation von Membranlipiden zum Stromverlust durch ChT beitragen.

4.3 Met-Oxidation an hERG

Met-Oxidationen können verschiedene Auswirkungen auf die Eigenschaften eines Proteins haben. So sind beispielsweise bei dem Enzym Glutaminsynthase 8 von 10 oberflächen-exponierten Met oxidierbar, ohne dass dies zur Proteindegradation führt (Levine *et al.*, 1996). Hingegen wurde für die Enzyme α -Antitrypsin, Subtilisin und D-AS-Oxidase gezeigt, dass die Oxidation eines einzelnen Met zum Verlust der Funktion unter oxidativen Bedingungen führt. Wurde dieses spezifische Met durch eine AS mit geringerer oxidativer Sensitivität substituiert, führte das zur Reduktion des Funktionsverlustes (Rosenberg *et al.*, 1984, Estell *et al.*, 1985, Ju *et al.*, 2000).

Diese Methode zur Identifizierung oxidationssensitiver Met haben wir auch bei hERG angewendet. Dazu wurden 11 Met einzeln durch Leucin substituiert und die verbleibenden 12 Met durch Deletion der entsprechenden Kanalbereiche entfernt (zur Übersicht: Bild 3.9). Keine dieser Deletions- und Substitutionsmutanten führte zu einer deutlichen Abnahme der ChT-Sensitivität. Nur eine gleichzeitige Substitution der Met 554, 651 und 713 führte zur Reduktion der ChT-Sensitivität von hERG (3Met: $I_{200} = 0.39 \pm 0.03$, WT: $I_{200} = 0.23 \pm 0.02$). Daraus schließen wir, dass ChT durch eine stufenweise Oxidation dieser drei Met zu einer kumulativen Reduktion der Stromamplitude führt. Die für die Wirkung von Superoxidanionen an hERG gezeigte Stromreduktion (Zhang *et al.*, 2003) könnte demnach zum Teil durch eine Oxidation dieser drei Met hervorgerufen werden. Dabei könnten sowohl Modifikationen der Schalteigenschaften als auch die Destabilisierung der Proteinstruktur zum Funktionsverlust führen.

Met-O weist gegenüber Met eine reduzierte Hydrophobizität sowie eine veränderte Größe und Form auf (Kim *et al.*, 2001). Dies kann zur Destabilisierung der Proteinstruktur und dem damit verbundenen Funktionsverlust führen. Da die Met 554 und 561 in der Kanalpore vermutlich für MSR-Enzyme nicht erreichbar sind, denken wir, dass eine Oxidation dieser AS zum irreversiblen Stromverlust führt. Met 713 hingegen liegt im zytoplasmatischen Teil des Kanals und könnte deshalb in eine Redoxregulation eingebunden sein. Über welchen Mechanismus die Oxidation dieser drei Met zur Stromreduktion von hERG beiträgt, ist jedoch noch unklar.

Die verbleibenden Met sind entweder für ChT nicht erreichbar oder deren Oxidation führt zu keiner Stromreduktion. Zudem generierten alle Substitutionsmutanten einen WT-ähnlichen Strom, was darauf schließen lässt, dass einzelne Mutationen beziehungsweise Modifikationen an diesen Positionen nicht grundsätzlich zum Funktionsverlust führen. Für viele Proteine wurde gezeigt, dass deren an der Oberfläche exponierte Met oxidiert werden können, ohne zum Funktionsverlust zu führen (zur Übersicht: Levine *et al.*, 1996). Wir vermuten daher, dass auch bei hERG noch einige weitere Met sensitiv gegenüber endogene ROS sind, deren einzelne Oxidation aber nicht die Stromamplitude des Kanals beeinträchtigt. Dies würde die Hypothese bestätigen, dass Met in Proteinen generell eine antioxidative Funktion haben (Luo und Levine, 2008). Möglicherweise kommt es im nativen System erst bei andauerndem oxidativen Stress zur kumulativen Oxidation mehrerer Met und dem damit verbundenen Funktionsverlust von hERG.

Als ein denkbarer Mechanismus, wie ROS an hERG agieren, wurde zu Beginn dieser Arbeit eine Redoxregulation der Stromamplitude über Met vermutet. Su *et al.* (2007) hatten gezeigt, dass bMSRA die ChT-induzierte Stromreduktion an hERG um über 50 % reduziert. Sie führten dies auf eine Reduktion von Met-O durch bMSRA zurück und vermuteten eine Redoxregulation des Kanals über Met. Eine solche Redoxregulation der Proteinfunktion durch MSRA wurde beispielsweise für Met 3 im Shaker-Kanal (Ciorba *et al.*, 1997) und für Met 146 im Calmodulin beschrieben (Sun *et al.*, 1999).

Wir nehmen allerdings an, dass der von Su *et al.* (2007) gezeigte bMSRA-Effekt hauptsächlich auf einem Abfangen der ChT-induzierten ROS beruht und nicht auf der enzymatischen Reduktion eines spezifischen Met. Eine Oxidation von Met 554, 651 und 713 trägt jeweils nur zu einem geringen Anteil zur Stromreduktion durch ChT bei. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete MSRA-Effekt auf einer enzymatischen Reduktion dieser drei Met beruht. Zudem liegen Met 554 und 651 im Porenbereich und wären somit für MSR-Enzyme vermutlich nicht erreichbar. Bekannt ist, dass ein hohes MSRA-Vorkommen in der Zelle den ROS-Gehalt erheblich reduziert (Picot *et al.*, 2005). Dies könnte erklären, warum bMSRA die Stromreduktion durch ChT so stark vermindert.

4.4 Cys-Modifikationen an hERG

Bisher wurde der Effekt Cys-modifizierender Substanzen an hERG-Kanälen, die in Oozyten exprimiert wurden, charakterisiert (Wang *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2002). In diesen Arbeiten führte eine externe Applikation von N-Ethylmaleimid (NEM) oder MTS-Substanzen zu keinen Veränderungen des hERG-Stromes. In der Arbeit von Hool *et al.* 2004 wurde der Effekt Cys-modifizierender Substanzen auf den I_{Kr} in den Myozyten von Meerschweinchen untersucht. Da die Stromamplitude bei einer extrazellulären Applikation von DTT oder DNTB (nicht membranpermeabel) unverändert blieb, vermuteten Hool *et al.* 2004, dass die Kanalfunktion von I_{Kr} nicht über eine Redox-modifikation von SH-Gruppen moduliert wird.

Wir beschreiben hier erstmalig die Effekte intrazellulär applizierter Cys-modifizierender Substanzen an hERG in einem humanen Expressionssystem. Da hERG eine starke Stromreduktion erfährt, sobald der Kontakt der Kanäle zum Zytoplasma abbricht (Diskussion: Gessner und Heinemann, 2003), war eine Applikation der MTS-Substanzen an der Membraninnenseite in der *inside-out*-Konfiguration nicht möglich. Deshalb erfolgten die Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration und die Applikation der Substanzen wurde über die *patch*-Pipette vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass Cys-modifizierende Substanzen an hERG in HEK293-Zellen die Stromamplitude reduzieren und damit eine Modifikation der Kanalfunktion über SH-Gruppen stattfindet. So führten 1 mM MTSES ($I_{200} = 0.24 \pm 0.02$) und 1 mM MTSEA ($I_{200} = 0.27 \pm 0.02$) zu starken Stromreduktionen, während der Effekt von 1 mM DTNB ($I_{200} = 0.54 \pm 0.02$) im Vergleich dazu schwächer war. Hierbei beruht die Stromreduktion, anders als beim ChT, nur auf der Modifikation von Cys. Alle drei Substanzen reagieren spezifisch mit SH-Gruppen, indem sie gemischte Disulfide ausbilden. Diese können beispielsweise umfangreiche Veränderungen der Kanalkonformation bewirken. Für L-Typ Ca^{2+} -Kanäle wurde gezeigt, dass SH-Modifikationen durch MTS-Substanzen die Zugänglichkeit bestimmter AS im Kanalprotein verringern (Fearon *et al.*, 2000). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum der nach MTSES-Behandlung verbleibende Strom durch ChT nicht weiter reduziert wird, obwohl dies aufgrund der oxidativen Sensitivität der drei Met zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise weist aber auch ein Teil der Kanalpopulation von vornherein eine größere Resistenz gegenüber ChT und MTSES auf.

4.4.1 Effekte von MTSES an hERG

Eine MTSES-Applikation bewirkte neben der Stromreduktion auch weitreichende Veränderungen der Schalteigenschaften des hERG-WT (Bild 4.3). Dabei führten die Modifikationen der Aktivierung und Inaktivierung dazu, dass die Kanäle innerhalb eines erweiterten Spannungsbereiches Strom leiteten (Bild 4.3 B). Die Inaktivierung wurde verlangsamt und die Deaktivierungskinetik wurde beschleunigt. Diese sehr umfassenden Veränderungen der hERG-Schalteigenschaften durch MTSES lassen vermuten, dass der hERG-Kanal bei

oxidativem Stress auf vielfältige Weise über mehrere Cys modifiziert wird. Möglicherweise beruhen sowohl die aktivierenden als auch die vermindernden Effekte endogener ROS an hERG auf der Modifikation von Cys.

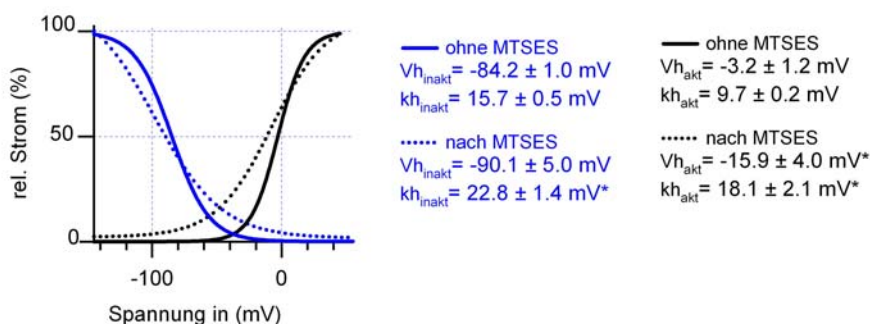
In der Arbeit von Zhang *et al.* (2005) wurden BK-Kanäle mit MTSET, MTSES und NEM behandelt, wobei alle drei Substanzen die gleichen Cys modifizierten, jedoch zu jeweils unterschiedlichen Effekten führten. Ob auch bei hERG die Veränderungen der Schalteigenschaften von der Ladung oder Größe der Cys-modifizierenden Substanz abhängt, gilt es in weiterführenden Experimenten noch zu klären.

MTSES-induzierte Stromreduktion:



MTSES-induzierte Veränderungen der Schalteigenschaften:

B Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung



C

Zeitverlauf der Aktivierung (ms)

ohne MTSES: $\tau_{akt} = 201.9 \pm 13.5$

nach MTSES: $\tau_{akt} = 115.3 \pm 9.7^*$

D

Inaktivierung bei 30 mV (ms)

$\tau_{inakt} = 13.9 \pm 0.4$

$\tau_{inakt} = 16.7 \pm 1.5^*$

E

Deaktivierung (ms)

$\tau_{deakt} (-145 \text{ mV}) = 21.3 \pm 0.8$
 $\tau_{deakt} (-120 \text{ mV}) = 36.2 \pm 1.1$
 $\tau_{deakt} (-95 \text{ mV}) = 73.8 \pm 3.2$

$\tau_{deakt} (-145 \text{ mV}) = 16.2 \pm 1.5^*$
 $\tau_{deakt} (-120 \text{ mV}) = 22.6 \pm 1.9^*$
 $\tau_{deakt} (-95 \text{ mV}) = 36.7 \pm 4.6^*$

Bild 4.3: MTSES-Effekte am hERG-Kanal

(A) Die Applikation von 1 mM MTSES führte innerhalb von 200 s zu einer 58 bis 75 %-igen Stromreduktion. (B) Darstellung der relativen Offen- beziehungsweise Inaktivierungswahrscheinlichkeit für 24 bis 30 Zellen jeweils vor (durchgezogene Linien) und für je 5 Zellen nach ChT-Applikation (gepunktete Linien). Der Bereich den beide Kurven überschneiden entspricht dem *window current*. Zur besseren Übersicht wurden hier nur die Anpassungen der Datenpunkte (siehe Tabelle 3.2) mit der Boltzmann-Gleichung dargestellt. (C) Beschleunigung der Aktivierung (ohne MTSES, n= 25; mit MTSES, n= 5). (D) Verlangsamung der Inaktivierung (ohne MTSES, n= 24; mit MTSES, n= 5). (E) Beschleunigung der Deaktivierung (ohne MTSES für n= 26-29; mit MTSES für n= 5). (*P<0.05/WT).

4.4.2 Mechanismen der MTSES-induzierten Stromreduktion

Wir haben gezeigt, dass Cys 723 partiell zur Stromreduktion durch MTSES beiträgt (C723S: $I_{200} = 0.61 \pm 0.03$; WT: $I_{200} = 0.29 \pm 0.01$) und die verbleibende Reaktivität auf dem N-Terminus (ΔN : $I_{200} = 0.68 \pm 0.02$) beruht.

4.4.2.1 N-Terminus

Die über den N-Terminus generierte Stromreduktion wird dabei durch eine MTSES-induzierte Beschleunigung der Deaktivierung hervorgerufen. In die für hERG-Kanäle typische langsame Deaktivierung sind der N-Terminus, AS des S4-S5-Verbindungsstückes und vermutlich auch der C-Terminus involviert (Vandenberg *et al.*, 2004). Eine vollständige oder partielle Deletion des N-Terminus oder Mutationen im S4-S5-Verbindungsstück führen zu schnell deaktivierenden Kanälen (Schönherr und Heinemann, 1996, Morais-Cabral *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998).

Wir zeigten, dass auch N-terminale Cys-Modifikationen eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik hervorrufen. Untersuchungen der Quartär-Struktur von hERG ergaben, dass der N-Terminus kompakt in die Proteinstruktur eingebettet ist (Miranda *et al.* 2008). Dieser enge Kontakt zu anderen Bereichen des Proteins könnte durch die Modifikation mehrerer N-terminaler Cys unterbrochen werden und so die Konformation des N-Terminus verändern. Dies könnte erklären, warum auch die Kanalmutante 10Cys, bei der alle 10 N-terminalen Cys substituiert wurden, eine beschleunigte Deaktivierungskinetik aufweist. Wir vermuten, dass sowohl eine Interaktion der AS 2-15 mit anderen Kanalbereichen als auch die chemischen Eigenschaften mehrerer N-terminaler Cys an der Ausprägung der langsam deaktivierenden Kanalkonformation im WT beteiligt sind. Folglich führt die MTSES-Modifikation mehrerer N-terminaler Cys zur Beschleunigung der Deaktivierungskinetik und der damit einhergehenden Stromreduktion. Über diesen Mechanismus könnten auch durch endogene ROS induzierte Cys-Modifikationen zur Reduktion der hERG-Stromamplitude führen.

4.4.2.2 Cys 723

Der Mechanismus, über den die MTSES-Modifikation von Cys 723 zur Stromreduktion beiträgt, ist bisher noch ungeklärt. Zwar ist die Deaktivierungskinetik von C723S von vornherein schneller als die des WT, wird aber durch MTSES noch weiter beschleunigt (Bild 3.29). Deshalb schließen wir eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik, wie wir sie für den N-Terminus beschrieben haben, als Ursache für die über Cys 723 vermittelte Stromreduktion aus. Vielmehr vermuten wir, dass Cys 723 im C-Terminus eine Position einnimmt, welche diesem Cys eine direkte Interaktion mit den Determinanten der Schalteigenschaften und/oder anderen Proteinen ermöglicht.

Für die C-Termini der *hyperpolarisation activated and cyclic nucleotid modulated* (HCN)-Kanäle liegt ein Strukturmodell vor (Zagotta *et al.*, 2003). Diesem Modell zu Folge

besteht das Verbindungsstück (*C-linker*) zwischen dem S6 und der cNBD aus 6 α -Helices, die jeweils durch kurze AS-Sequenzen miteinander verbunden sind. Es wird hypothetisiert, dass dieser *C-linker* direkt unter dem zytoplasmatischen Porenbereich eine tetramere Struktur (Bild 4.4) mit Kontakten zur PAS-Domäne und dem N-Terminus ausbildet (Zagotta *et al.*, 2003). Somit können Konformationsänderungen in diesem Bereich direkt das Schaltverhalten der Kanäle beeinflussen. Es wird angenommen, dass bei HCN-Kanälen die Bindung von cAMP zu Konformationsänderungen in der cNBD führt. Über den *C-linker* werden diese Änderungen der Proteinstruktur direkt an das Öffnen der HCN2-Pore bei hyperpolarisierenden Potentialen gekoppelt.

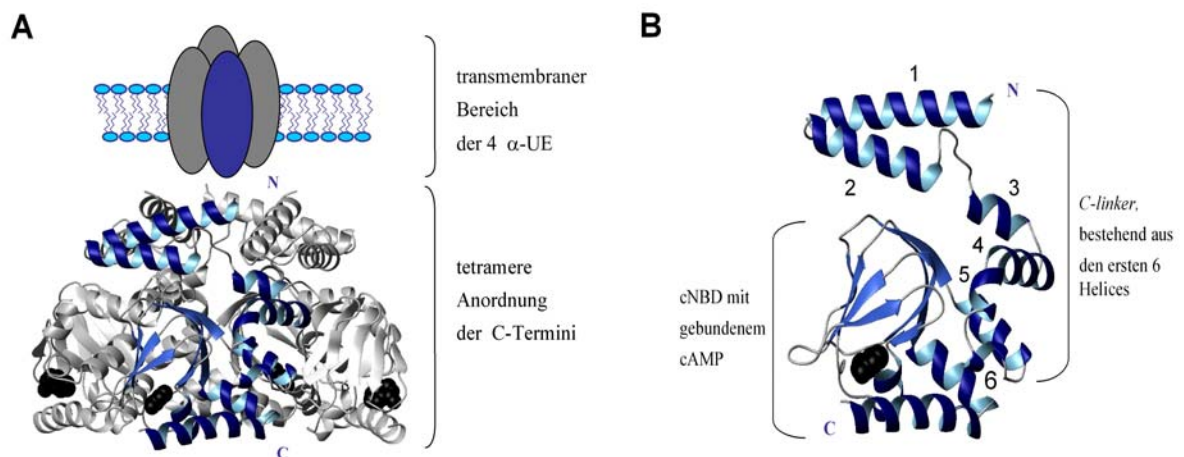


Bild 4.4: Strukturmodell der C-Termini im HCN2-Kanal (nach Zagotta *et al.*, 2003)

(A) HCN2-Tetramer (ohne N-Termini) senkrecht in die Membran eingelagert dargestellt. Der zytoplasmatische Bereich entspricht der Struktur der vier C-Termini, an denen jeweils ein cAMP-Molekül (schwarz) gebunden ist (pdb-file: 3Pbz aus Zagotta *et al.*, 2003). Eine der α -UE des HCN2-Kanals ist blau hervorgehoben und der N- und C-Terminus markiert. (B) Struktur des C-Terminus einer HCN2 α -UE mit dem *C-linker* (6 α -Helices) und der cNBD (vier α -Helices und 8 β -Faltblattstrukturen). Die 6 α -Helices des *C-linkers* sind nummeriert. Innerhalb der von der cNBD gebildeten Struktur bindet ein Molekül cAMP.

Die Strukturen des *C-linkers* und der cNBD wurden auch für die C-Termini von hERG- und hEAG1-Kanälen beschrieben (Zagotta *et al.*, 2003). Jedoch sind in diesen Kanälen nicht alle für die Bindung zyklischer Nukleotide in HCN2-Kanälen wichtigen AS konserviert. Für die beiden Kanäle der EAG-Familie wird zudem nur eine schwache Modulation des Kanals durch eine direkte Bindung von cAMP an die cNBD beschrieben (Brüggemann *et al.*, 1993, Cui *et al.*, 2000). Zagotta *et al.*, (2003) stellten daher die Hypothese auf, dass der *C-linker* auch in diesen Kanälen Konformationsänderungen an die Kanalaktivität koppelt, diese aber nicht durch cAMP hervorgerufen werden. Vorstellbar ist, dass der *C-linker* in hERG an der Modifikation der Kanalfunktion durch Lysophosphatidylcholin (LPC) oder hERG-Interaktionsproteinen wie KCNE1 und TNF-Rezeptor 1 beteiligt ist (Wang *et al.*, 2002, Um *et al.*, 2007). Entsprechend dem HCN2-Strukturmodell befindet sich die AS 723 im N-terminalen Bereich der vierten

α -Helix. Demnach liegt Cys 723 im *C-linker* von hERG in einer schlaufenförmig von der cNBD abgewinkelten Position. Diese exponierte Lage könnte erklären, warum in hERG das Cys 723 durch ChT und MTSES modifizierbar ist. Eine Substitution von Cys 723 durch Serin führte zu Kanälen, die schon bei negativen Potentialen öffnen und schneller deaktivieren als der WT. Die gleichen Modifikationen des Schaltverhaltens haben wir auch bei einer Behandlung des WT mit MTSES beobachtet. Aus diesem Grund vermuten wir, dass die MTSES-induzierten Veränderungen des WT-Schaltverhaltens hauptsächlich auf einer Modifikation von Cys 723 beruhen. Zudem liegt Cys 723 innerhalb einer Kanalstruktur, die an einer Kopplung von Konformationsänderungen und Schaltmechanismus beteiligt ist. Da Cys 723 außerdem für ROS gut erreichbar ist, kommen wir zu folgender Schlussfolgerung: Eine Modulierung des Aktivierungs- und Deaktivierungsverhaltens sowie der Stromamplitude von hERG durch ROS erfolgt über Cys 723.

Neben Cys 723 liegen auch Met 713 und Cys 740 innerhalb des *C-linkers* von hERG und tragen zur oxidativen Sensitivität von hERG bei (Bild 4.5). Werden diese AS substituiert, führt das zu Kanälen, die eine geringere Stromreduktion durch ChT beziehungsweise MTSES erfahren.

A

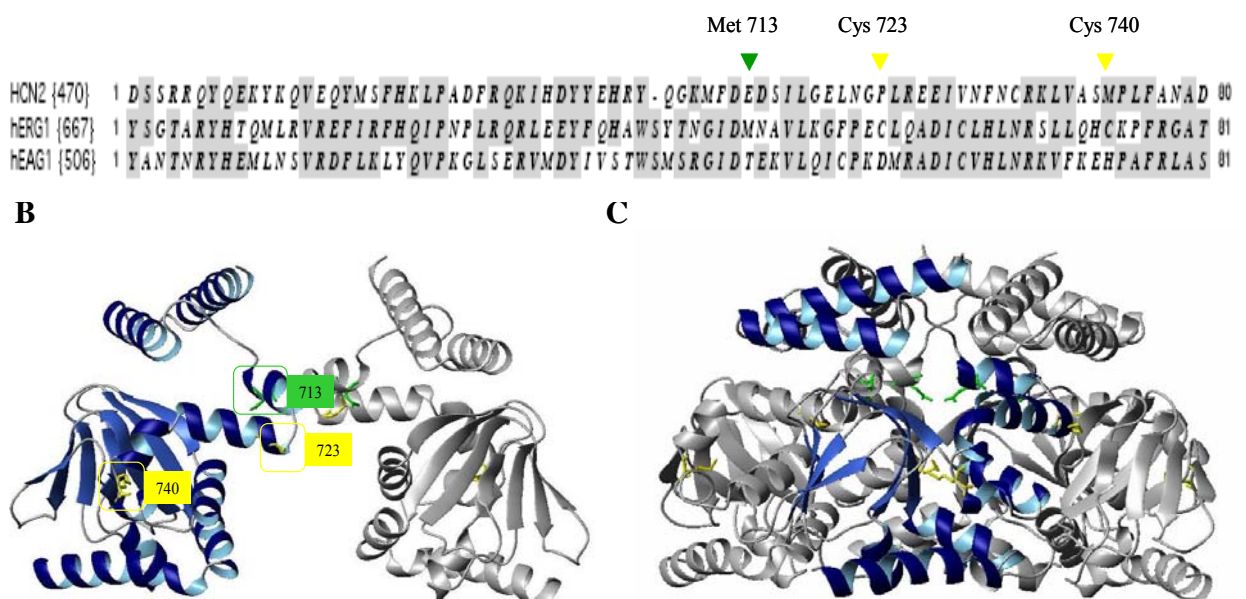


Bild 4.5: Positionierung der AS 713, 723 und 740 im C-Terminus von hERG in Anlehnung an das Strukturmodell des HCN2-Kanals

(A) Sequenzvergleich des C-linkers des HCN2-, HERG- und hEAG1-Kanals. Die Positionen der AS 713, 723 und 740 sind mit farbig markiert. (B) Zwei der vier C-Termini entsprechend ihrer Anordnung im HCN2-Kanal (Zagotta *et al.*, 2003). An den Positionen 713, 723 und 740 sind die in der HCN2-Sequenz vorkommenden AS als Stabmodelle eingezeichnet. Die Farbkodierung dieser AS entspricht der in (A). Bei dem blauen C-Terminus wurden die Positionen der drei AS zusätzlich mit Kästchen umrahmt. (C) C-Termini aller vier Untereinheiten.

Über welchen Mechanismus dies geschieht, ist unbekannt. Eine Substitution dieser AS führt zu Veränderungen der Schalteigenschaften. Diese Veränderungen stimmen aber nicht mit denen überein, die wir für ChT- beziehungsweise MTSES-behandelte WT-Kanäle gezeigt haben. Demnach hat hier eine Substitution andere Effekte auf die Schalteigenschaften, als die oxidative Modifikation des Kanals. Deshalb können wir an dieser Stelle keine Schlüsse über eine mögliche oxidative Regulation von hERG über Met 713 und Cys 740 ziehen.

Drei der von uns identifizierten oxidationssensitiven AS liegen in einer Region, die wahrscheinlich an einer Kopplung zwischen der Ligandenbindung und dem Schaltmechanismus des Kanals beteiligt ist. Entsprechend der Hypothese von Cherubini *et al.* (2005) liegt hERG im nativen Gewebe als Multiproteinkomplex vor. Demnach wäre es vorstellbar, dass ROS-Modifikationen des *C-linkers* in nativen hERG-Kanälen andere Effekte hervorrufen als an heterolog exprimierten Kanälen. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb wir in SH-SY5Y-Zellen eine geringere MTSES-induzierte Stromreduktion an hERG beobachtet haben als in HEK293-Zellen.

Der zur Familie der EAG-Kanäle gehörende hEAG1-Kanal erfährt durch ChT und MTSES gleichfalls eine starke Stromreduktion. Allerdings sind die AS Met 713, Cys 723 und Cys 740 weder im HCN2- noch im hEAG1-Kanal konserviert (Bild 4.5). Weiterführende Arbeiten werden klären müssen, ob der *C-linker* auch in hEAG1-Kanälen in eine oxidative Modulation des Kanals eingebunden ist.

4.5 Korrelation der Schalteigenschaften und oxidativen Sensitivität

4.5.1 Deaktivierung

Sowohl die Behandlung mit MTSES als auch die mit ChT führte bei hERG zu einer beschleunigten Deaktivierung. Für die Wirkung von extern appliziertem H₂O₂ an hERG in CHO-K1-Zellen wurde ebenfalls eine Beschleunigung der Deaktivierung beschrieben (Berube *et al.*, 2001). Möglicherweise beruht die durch diese drei Substanzen hervorgerufene Beschleunigung der Deaktivierung auf denselben Mechanismen. Wir haben für MTSES gezeigt, dass die Bildung gemischter Disulfide (Kenyon und Bruice, 1977) an N-terminalen Cys eine Beschleunigung der Deaktivierung bewirkt und dies zu einer Reduktion der Stromamplitude beiträgt. Eine Ausbildung gemischter Disulfide kann auch durch H₂O₂ oder durch HOCl, das bei der Dissoziation von ChT entsteht, induziert werden (Carr und Winterbourn, 1997). Wir vermuten, dass die durch eine Disulfidbildung erzeugte Beschleunigung der Deaktivierung ein genereller Mechanismus ist, mit dem die Stromamplitude von hERG durch ROS reduziert werden kann. Dass H₂O₂ an hERG nicht zur Reduktion der Stromamplitude führt (Berube *et al.*, 2001), erklären wir damit, dass H₂O₂ sowohl die Deaktivierung als auch die Aktivierung von hERG verändert. Die aktivierenden Effekte von H₂O₂ überlagern möglicherweise die durch eine Beschleunigung der Deaktivierung hervorgerufene Stromreduktion.

4.5.2 Inaktivierung

Für einige Kaliumkanäle mit C-Typ-Inaktivierung wurde gezeigt, dass die Applikation von ChT eine Stromreduktion bewirkt. Bei ShB(Δ 6-46)-Kanälen führt der inaktivierte Zustand zu einer Konformation, die eine verstärkte Stromreduktion durch ChT ermöglicht. Anhand mehrerer Inaktivierungsmutanten dieses Kanals konnte eine Korrelation zwischen der Inaktivierungsgeschwindigkeit und dem Zeitverlauf der ChT-induzierten Stromreduktion gezeigt werden (Schlief *et al.*, 1996).

Wird die Membran einer Zelle depolarisiert, gehen die in dieser Membran eingelagerten hERG-Kanäle in den inaktivierten Zustand über. Die C-Typ-Inaktivierung von hERG ist sehr schnell und spannungsabhängig und wird als unabhängig vom N-Terminus beschrieben (Schönherr und Heinemann, 1996, Smith *et al.*, 2002). In diesem inaktivierten Zustand wies hERG eine geringere ChT-Sensitivität auf als im geschlossenen Zustand (Bild 3.5 A). Wenn wir jedoch das Inaktivierungsverhalten von hERG durch Mutationen modifizierten, zeigte sich ein anderer Zusammenhang. Eine Beschleunigung der Inaktivierungskinetik, wie in der Kanalmutante hERG-M645L, führte zu einer verstärkten Stromreduktion durch ChT und MTSES. Dagegen war die nicht inaktivierende Kanalmutante hERG-S620T weniger sensitiv gegenüber beiden Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass es auch für hERG ein Zusammenhang zwischen der C-Typ-Inaktivierung und der ChT- beziehungsweise MTSES-Sensitivität gibt. Jedoch unterscheiden sich die durch M645L oder S620T hervorgerufenen Veränderungen der Kanalkonformation von denen, mit welchen der Inaktivierungsprozess im hERG-WT verbunden ist. Auch die Stromamplitude des nicht inaktivierenden hEAG1-Kanals wurde durch MTSES und ChT reduziert. Eine Übertragung der Inaktivierungseigenschaften von hERG auf hEAG1 (hEAG1-T432S/A443S) führte zu einer Abschwächung dieser ChT-Sensitivität.

Grundsätzlich scheinen also die bei der Inaktivierung von hERG ablaufenden Konformationsänderungen den Zugang spezifischer AS für modifizierende Substanzen zu verändern. An der Ausprägung der C-Typ-Inaktivierung von hERG sind aber mehr Determinanten beteiligt als die AS an den Positionen 620 und 631. Anhand unserer Experimente kann daher noch keine klare Aussage darüber getroffen werden, wie die Inaktivierungseigenschaften von hERG dessen Sensitivität gegenüber endogenen ROS determinieren.

4.6 ROS-induzierte Stromreduktion an hERG

Der Haupteffekt, den Met- und/oder Cys-modifizierenden Substanzen an hERG hervorrufen, besteht in einer circa 70 bis 80 %-igen Reduktion der Stromamplitude. Eine vergleichbar starke Inhibierung erfahren endogene hERG-Ströme in GH₃-laktotrophen Zellen, wenn diese mit 10 μ M Ceramid behandelt werden (Wu *et al.*, 2001). Zu einer circa 35 %-igen Inhibierung von hERG führt eine extrazelluläre Behandlung der Zellen mit

TNF α (100 ng/ml) oder dem Superoxidanionen produzierendem Xanthin/Xanthin Oxidase-System (X/XO) (Wang *et al.*, 2004). Diese Stromreduktionen werden auf eine Inhibierung des Kanals durch endogene ROS zurückgeführt (Wang *et al.*, 2004), wobei die molekularen Grundlagen einer solchen ROS-induzierten Stromreduktion bisher unbekannt waren.

Wir zeigten erstmalig, dass die ROS-induzierte Reduktion des hERG-Stromes durch spezifische AS und/oder Strukturen des Kanals vermittelt wird (Bild 4.5). Wir nehmen an, dass ROS an endogenen hERG-Strömen hauptsächlich über Modifikationen des *C-linkers* zur Stromreduktion führen. Innerhalb dieser Region befinden sich drei oxidationssensitive AS, von denen Cys 723 eine zentrale Rolle einnimmt. Modifikationen von Cys 723 führen sowohl zu Veränderungen der Schalteigenschaften als auch zur Reduktion der Stromamplitude. Kanäle, deren Cys 723 modifiziert wird, leiten aufgrund der veränderten Schalteigenschaften mehr Auswärts- und weniger Einwärtsstrom. Dies entspricht genau den Veränderungen des I_{Kr}-Stromes in ventrikulären Myozyten, wenn diese mit 30 μ M H₂O₂ behandelt werden (Berube *et al.*, 2001). Gleichzeitig führt die oxidative Modifikation von Cys 723 über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus zu einer weiteren Reduktion des an der Repolarisierung beteiligten hERG-Stromes. Beide Prozesse zusammen würden zu einer Verlängerung der APD führen.

Als weitere Determinante der ROS-induzierten Stromreduktion an hERG haben wir neben Cys 723 auch noch den N-Terminus identifiziert. Wir haben gezeigt, dass eine hERG-Stromreduktion über die oxidative Modifikation mehrerer N-terminaler Cys und der damit einhergehenden Beschleunigung der Deaktivierung stattfinden kann. Inwiefern eine über diesen Mechanismus induzierte Stromreduktion an endogenen hERG-Kanälen stattfinden kann, könnte gewebsspezifisch determiniert sein. So wurde für die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und für primäre Tumorzelllinien gezeigt, dass deren hERG-Ströme vorzugsweise durch heteromere Kanäle vermittelt werden. Diese Heteromere bestehen aus den beiden Spleißvarianten hERG1a und hERG1b (Crociani *et al.*, 2003). Dabei bezeichnet hERG1a die ursprünglich von Warmke und Ganetzky (1994) beschriebene und in dieser Arbeit verwendete Sequenz der hERG α -UE (Bild 4.6). hERG1b ist 347 AS kürzer als hERG1a und weist eine unikale Sequenz von 29 AS am N-terminalen Ende auf (Lees-Miller *et al.*, 1997), welche keine Met und Cys enthält. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Kanalmutante Δ N-hERG wurden die AS 2 bis 373 entfernt (Schönherr und Heinemann, 1996).

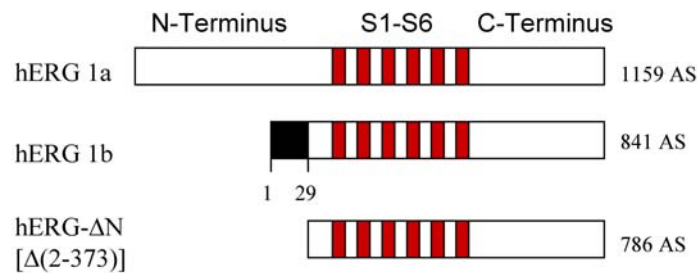


Bild 4.6: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von hERG1a, hERG1b und Δ N-hERG

S1-S6 sind als rote Kästchen dargestellt. Mit Ausnahme des schwarz markierten Bereiches in hERG1b sind alle drei Sequenzen identisch.

Die an der Ausprägung der langsam deaktivierenden Kanalkonformation beteiligten Strukturen, wie die AS 2-15 und mehrere N-terminale Cys, sind in hERG1b und hERG- Δ N nicht vorhanden. Dementsprechend weisen sowohl die hERG-Ströme in SH-SY5Y-Zellen (Larsen *et al.*, 2008) als auch die durch hERG- Δ N (in HEK293-Zellen) vermittelten Ströme eine beschleunigte Deaktivierungskinetik auf (siehe A-5). Wir vermuten daher, dass diese von vornherein beschleunigten Deaktivierungskinetiken durch MTSES nicht weiter beschleunigt werden können. Deshalb erfahren hERG-Ströme in SH-SY5Y-Zellen (Bild 3.17) und Δ N-hERG eine geringere Stromreduktion durch MTSES als homomere Kanäle (Bild 3.21). Larsen *et al.* (2008) beschreiben eine direkte Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an hERG1b-mRNA und der Deaktivierungsgeschwindigkeit von hERG. Möglicherweise bestimmt also das hERG1a/hERG1b-Verhältnis im jeweiligen Zelltyp die Deaktivierungseigenschaften des Kanals und darüber auch das mögliche Ausmaß einer über den N-Terminus vermittelten Stromreduktion durch ROS. In humanen Kardiomyozyten assemblieren zwar beide Spleißvarianten miteinander (Phartiyal *et al.*, 2007), aber die dabei entstehenden heteromeren Kanäle tragen nur minimal zum kardialen I_{Kr} -Strom bei (Jones *et al.*, 2004). Demnach wäre in Kardiomyozyten das hERG1a/hERG1b-Verhältnis und damit auch das mögliche Ausmaß einer über den N-Terminus vermittelten Stromreduktion durch ROS größer als in den SH-SY5Y-Zellen.

Neben Cys 723 und dem N-Terminus führt auch die kumulative Oxidation der Met 554, 651 und 713 sowie des Cys 740 zu der ROS-induzierten Stromreduktion an hERG. Bei oxidativem Stress könnte diese Stromreduktion dazu beitragen, dass weniger repolarisierender Strom während des AP zur Verfügung steht. Das wiederum würde zu einer Verlängerung der APD und damit zum Entstehen von Arrhythmien führen (Bild 4.7).

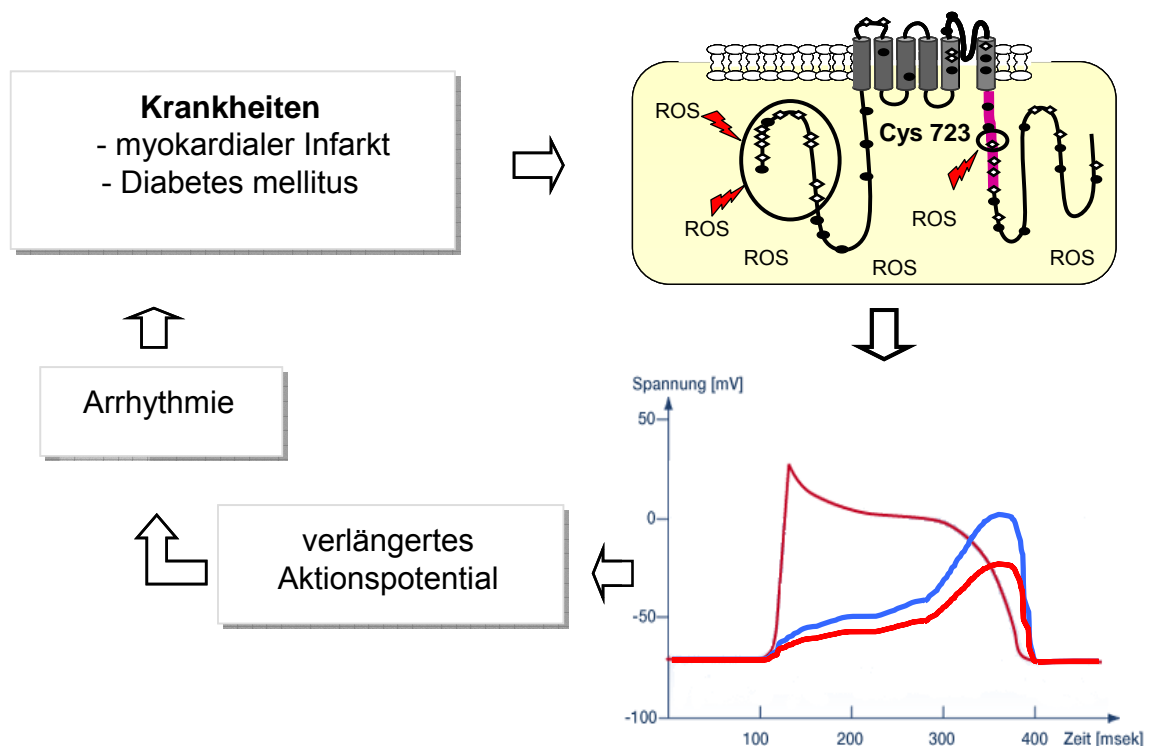


Bild 4.7: Modellvorstellung einer oxidativen Regulation von hERG

Nach einem myokardialen Infarkt und bei Diabetes Patienten kommt es zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese bewirken durch Modifikation N-terminaler Cys und des Cys723 eine Reduktion des hERG Stromes. Die Abnahme des repolarisierenden Stromes führt zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und erhöht das Risiko dieser Patienten, eine Arrhythmie zu erleiden.

Wie sich oxidativer Stress letztendlich auf die schnell repolarisierende Stromkomponente des AP auswirkt, hängt unter anderem vom Zusammenspiel der verschiedenen ROS und deren Wirkungsarealen ab. So führt extrazelluläres H_2O_2 zu einer Zunahme der hERG-Amplitude und bewirkt dadurch eine Verkürzung der APD. Dagegen führt bei Diabetikern, Ischämiepatienten und Patienten mit kongestivem Herzfehler ein erhöhter ROS-Gehalt zur Reduktion des kardialen I_{Kr} -Stromes (Zhang *et al.*, 2006). Die bei diesen Erkrankungen oft auftretende Verlängerung der APD könnte die Folge einer Inhibierung von hERG durch bestimmte ROS sein.

Wir haben in dieser Arbeit Cys 723 als die bedeutendste Determinante einer Cys-spezifischen ROS-Interaktion am Kanal identifiziert. Weitere Arbeiten sollen zeigen, ob Cys 723 auch in eine durch endogene ROS-Produzenten wie $TNF\alpha$, Ceramid oder hohe Glukosekonzentrationen (Bild 4.1) hervorgerufene Stromreduktion involviert ist.

5 Zusammenfassung

Oxidativer Stress spielt eine Rolle in der Pathogenese vieler Herzkrankheiten. Beispielsweise kommt es bei Patienten mit Diabetes mellitus aufgrund der Hyperglykämie zu einer verstärkten Bildung von *reactiven oxygen species* (ROS). Bei circa 25 % aller Diabetiker wird eine pathologische Verlängerung des kardialen Aktionspotentiales (AP), das so genannte *long-QT-syndrom* (LQTS) diagnostiziert. Diese AP-Verlängerung kann auf eine Inhibierung des an der Repolarisierung beteiligten Kaliumstromes I_{Kr} zurückgeführt werden, als dessen Hauptkomponente hERG identifiziert wurde. Sowohl der I_{Kr} in den Myozyten von Kaninchen als auch heterologe hERG-Ströme in humanen Zellen werden durch endogene ROS inhibiert. Eine derartige ROS-induzierte Inhibierung von hERG könnte zur AP-Verlängerung bei Diabetikern und der damit verbundenen gesteigerten Mortalitätsrate beitragen. Daher sehen wir hERG als ein potentiell Zielprotein zur Behandlung von Kardiomyopathien. Das Ziel dieser Arbeit war, die molekularen Grundlagen einer ROS-induzierten Modulation von hERG zu identifizieren. Der Fokus lag dabei auf der Modifikation von Methioninen (Met) und Cysteinen (Cys), da eine Modulation des Kanals im Sinne einer Redoxregulation nur über diese beiden Aminosäuren möglich wäre. Zur Simulation der Wirkung endogener ROS an hERG wurden spezifisch Met- und/oder Cys-modifizierende Substanzen verwendet. Die Effekte dieser Substanzen an hERG sollten elektrophysiologisch mittels *patch-clamp*-Technik charakterisiert und die Reste, auf deren Modifikation diese Effekte beruhen, durch molekularbiologische Methoden identifiziert werden.

- Der Haupteffekt von Chloramin T (ChT) als Met- und Cys-spezifische Substanz und MTSES als Cys-spezifische Substanz besteht in einer 56 bis 80 %-igen Reduktion der Stromamplitude. Diese Stromreduktion findet an heterologen und endogenen hERG-Strömen statt. Eine vergleichbar starke Inhibierung von hERG wird beobachtet, wenn der ROS-Gehalt der Zellen durch ansteigende Ceramid- oder Glukosekonzentrationen erhöht ist (Wu *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003).
- Diese ChT- und MTSES-induzierten Stromreduktionen finden spezifisch an hERG-Kanälen statt. Die Stromamplitude des kardialen Kaliumkanals Kv1.5 ist vollständig unsensitiv gegenüber beiden Substanzen.
- Im ersten Teil der Arbeit werden drei oxidationssensitive Met (Met 554, Met 651, Met 713) identifiziert, deren kumulative Oxidation partiell zur ChT-induzierten Stromreduktion beitragen. Außerdem beruht die ChT-induzierte Stromreduktion noch auf der Modifikation der Cys 723 und 740 sowie auf weiteren bisher ungeklärten Mechanismen.
- Im zweiten Teil der Arbeit werden die Effekte eines intrazellulär applizierten Cys-modifizierenden Agens (MTSES) an hERG beschrieben. Die MTSES-Applikation bewirkt neben der Stromreduktion auch Veränderungen der Aktivierungs-, Deaktivierungs-,

und Inaktivierungseigenschaften von hERG. Aufgrund dieser sehr umfassenden Veränderungen der Schalteigenschaften vermuten wir, dass hERG bei oxidativem Stress auf vielfältige Weise über mehrere Cys modifiziert wird.

- Ein Teil der MTSES-induzierten Stromreduktion wird durch eine über mehrerer N-terminale Cys vermittelte Beschleunigung der Deaktivierung hervorgerufen. Über diesen Mechanismus könnte auch eine durch endogene ROS induzierte Cys-Modifikation zur Reduktion der hERG-Stromamplitude führen.
- Der Hauptteil der MTSES-induzierten Stromreduktion und die Veränderungen der Schalteigenschaften werden über das Cys 723 vermittelt. Cys 723 liegt im *C-linker* des Kanals, welcher das S6 mit der C-terminalen zytosolischen Domäne verbindet. Daher ist dieses Cys gut erreichbar für endogene ROS und kann vermutlich eine direkte Interaktion mit den Determinanten der Schalteigenschaften und/oder anderen Proteinen eingehen.

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass die ROS-induzierte Reduktion des hERG-Stromes durch spezifische Aminosäurenreste und/oder Strukturen am Kanal vermittelt wird. Eine Redoxregulation der Stromamplitude von hERG über Met, wie sie in der Arbeit von Su *et al.* (2007) diskutiert wurde, halten wir für unwahrscheinlich. Vielmehr gehen wir davon aus, dass eine ROS-Modulation an hERG vorwiegend über Cys, speziell über das Cys 723 stattfindet.

5 Summary

Oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis of many heart diseases. Patients with diabetes mellitus for instance exhibit an increased generation of reactive oxygen species (ROS). Approximately 25 % of the diabetics develop a pathological prolongation of the cardiac action potential (AP) the so-called long-QT-syndrome (LQTS). This AP prolongation can be attributed to an inhibition of the repolarizing potassium current I_{Kr} . The hERG potassium channel was identified as the main component of I_{Kr} . Both I_{Kr} in cardiac myocytes of rabbit and heterologous hERG currents in human cells are inhibited by endogenous ROS. Such a ROS-induced inhibition of hERG could contribute to the AP prolongation of diabetics and to their higher mortality rates. Therefore hERG is an important target for the treatment of cardiomyopathies.

The aim of this study was to identify the molecular basis for the ROS-induced modulation of hERG. We focused on the modification of methionines (Met) und cysteines (Cys), because these residues are most susceptible to redox regulation. To mimic the effects of endogenous ROS on hERG we used agents that specifically modify Cys and/or Met residues. The characterization of the effects of these substances was performed using the patch-clamp-technique. To identify the residues that are responsible for these effects we used site-directed mutagenesis of the hERG gene.

- The main effect of Chloramin T (ChT) as a Met- and Cys-specific substance and MTSES as a Cys- specific substance is a reduction of the current amplitude by up to 80%. This reduction of the current amplitude is observed for heterologously expressed and endogenous hERG channels. A comparable inhibition of hERG was found in cells with a high ROS content in response to rising ceramid or glucose concentrations (Wu *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003).
- The ChT- and MTSES-induced current reduction is specific to channels of the EAG-family. The current amplitude of Kv1.5, another cardiac potassium channel, is insensitive to both substances.
- Within the first part of this work we identify three oxidationsensitive Met (Met 554, Met 651, Met 713), whose cumulative oxidation leads to some extent to the ChT-induced current reduction. Moreover, the ChT-induced current reduction depends on the modification of Cys 723 und 740 in addition to further unknown mechanisms.
- In the second part of this work a characterization of the effects of an intracellularly applied Cys-modifying agent on hERG was performed. Beside the reduction of current, applying MTSES to heterologously expressed hERG channels leads to modifications of the activation, deactivation and inactivation characteristics of hERG. On the basis of these extensive modulations we believe that hERG is regulated by several Cys.

- The N-Terminus is an additional determinant of the MTSES-induced reduction of current. Modification of several N-terminal Cys accelerated the deactivation kinetics and this acceleration leads to the reduction of current. This mechanism could be one possibility how endogenous ROS reduce hERG currents via modification of specific Cys.
- Both the MTSES-induced reduction of the current amplitude and the modification of the gating parameters are mediated by Cys 723 situated in the C-linker, connecting the S6 gate with the C-terminal cytosolic domain. This Cys confers responsiveness of hERG to ROS and is located such it can interact directly with structural elements of the gating machinery and/or accessory proteins.

We show in this work for the first time that the ROS-induced reduction of hERG current is mediated via specific amino acids and/or structures of the channel protein. It seems unlikely that a redox regulation of Met plays a role in the modulation of the hERG current in the way postulated by Su *et al.* (2007). We rather conclude that a ROS modulation of hERG occurs predominantly at cysteine residues, especially at Cys 723 in the C-linker.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott G.W. and Goldstein S.A.: Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv.* 2001, **1**: 95-107
- Adams J.D. and Odunze I.N.: Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad Biol Med.* 1991, **10**: 161-169
- Aidley D.J. and Stansfield P.R.: Ion channels-molecules in action. Cambridge University Press. 1996
- Akhavan A., Atanasiu R., Noguchi T., Han W., Holder N., Shrier A.: Identification of the cyclic-nucleotide-binding domain as a conserved determinant of ion-channel cell-surface localization. *J Cell Sci.* 2005, **118**: 2803-2812
- Ambrosio G., Zweier J.L., Duilio C., Kuppusamy P., Sanoro G., Elia P.P., Tritto I., Crillio P., Condorelli M., Chiarello M.: Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem.* 1993, **268**: 18532-18541
- Anumonowo J.M., Horta J., Delmat M., Taffet S.M., Jalife J.: Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophys J.* 1999, **77**: 282-298
- Arcangeli A., Faravelli L., Bianchi L., Rosati B., Gritti A., Vescovi A., Wanke E., Olivetto M.: Soluble or bound laminin elicit in human neuroblastoma cells short-or long-term potentiation of a K^+ inwardly rectifying current: relevance to neuritogenesis. *Cell Adhes Commun.* 1996, **4**: 369-385
- Babbs C.F.: Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med.* 1990, **8**: 191-200
- Balasubramanian D., Du X., Zigler J.S.: The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. *Photochem Photobiol.* 1990, **52**: 761-768
- Baumann A., Krah-Jentgens I., Müller R., Müller-Holtkamp F., Seidel R., Kecskemethy N., Casal J., Ferrus A., Pongs O.: Molecular organization of the maternal effect region of the Shaker complex of *Drosophila*: characterization of an I(A) channel transcript with homology to vertebrate NA channel. *EMBO J.* 1987, **6**: 3419-3429
- Bai Y., Wang J., Shan H., Zhang Y., Luo X., Yang B., Wang Z.: Sphingolipid metabolite ceramide causes metabolic perturbation contributing to HERG K^+ channel dysfunction. *Cell Physiol Biochem.* 2007, **20**: 429-440
- Barros F., Gomez-Varela D., Vilorio C.G., Palomero T., Giraldez T., Pena P.: Modulation of human erg K^+ channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol.* 1998, **511**: 333-346
- Baynes J.W., Thorpe S.R.: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999, **48**: 1-9
- Becker L.B., Vanden Hoek T.L., Shao Z.H., Li C.Q., Schumacker P.T.: Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol.* 1999, **277**: 2240-2246
- Berlett B.S. and Stadtman E.R.: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997, **272**: 20313-20316

- Bertaso F., Sharpe C.C., Hendry B.M., James A.F.: Expression of voltage-gated K⁺ channels in human atrium. *Basic Res Cardiol.* 2002, **97**: 424-433
- Berube J., Caouette D., Daleau P.: Hydrogen peroxide modifies the kinetics of HERG channel expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001, **297**: 96-102
- Bian J., Cui J., McDonald T.V.: HERG K⁺ channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res.* 2001, **89**: 1168-1176
- Bishop E. and Jennings V.J.: Titrimetric analysis with chloramine-T. *Talanta Pergamon Press Ltd.* 1958, **1**: 197-212
- Biteau B., Labarre J., Toledano M.B.: ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 2003, **425**: 980-984
- Black S.D., Mould D.R.: Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Anal Biochem.* 1991, **193**: 72-82
- Brüggemann A., Pardo L.A., Stühmer W., Pongs O.: Ether-a-gogo encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* 1993, **365**: 445-448
- Carmeliet H.: Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999, **79**: 917-1017
- Carr A.C. and Winterbourn C.C.: Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem J.* 1997, **327**: 275-281
- Chandy K.G.: Simplified gene nomenclature. *Nature* 1991, **352**: 26
- Cherubini A., Hofmann G., Pillozzi S., Guasti L., Crociani O., Cilia E., Stefano P., Degani S., Balzi M., Olivotto M., Wanke E., Bechetti A., Defilippi P., Wymore R., Arcangeli A.: Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to β 1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell.* 2005, **16**: 2972-2983
- Choe S.: Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 2002, **3**: 115-121
- Chouabe C., Drici M.D., Romey G., Barhanin J., Lazdunski M.: HERG and KvLQT1/Isk, the cardiac K⁺ channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol Pharmacol.* 1998, **54**: 695-703
- Ciorba M.A., Heinemann S.H., Weissbach H., Brot N., Hoshi T.: Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997, **94**: 9932-9937
- Clapham D.E.: More pieces of the K⁺ ion channel puzzle. *Nat Struct Biol.* 1999, **6**: 807-810
- Clenand W.W.: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 1963, **3**: 480-482
- Clermont G., Vergely C., Jazayeri S., Lahet J.J., Goudeau J.J., Lecour S., David M., Rochette L., Girard C.: Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002, **96**: 80-87
- Corr P.B., Cain M.E., Witkowski F.X., Price D.A., Sobel B.E.: Potential arrhythmogenic electrophysiological derangements in canine Purkinje fibers induced by lysophosphoglycerides. *Circ Res.* 1979, **44**: 822-832

- Crociani O., Guasti L., Balzi M., Becchetti A., Wanke E., Olivotto M., Wymore R.S., Arcangeli A.: Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem.* 2003, **278**: 2947-2955
- Coor P.B., Yamada K.A., Creer M.H., Sharma A.D., Sobel B.E.: Lysophosphoglycerides and ventricular fibrillation early after onset of ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1987, **5**: 45-53
- Cotgreave I.A. and Gerdes R.G.: Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, **242**:1-9
- Cui J., Kagan A., Qin D., Mathew J., Melman Y.F., McDonald T.V.: Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem.* 2001, **276**: 17244-17251
- Cui J., Melman Y., Palma E., Fishman G. I., McDonald T.V.: Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways. *Curr Biol.* 2000, **10**: 671-674
- Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetschner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998, **280**: 69-77
- Dumaine R., Roy M.L., Brown A.M.: Blockade of HERG and Kv1.5 by Ketoconazole. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, **286**: 727-735
- Dun W., Jiang M., Tseng G.N.: Allosteric effects of mutations in the extracellular S5-P loop on the gating and ion permeation properties of the hERG potassium channel. *Pflüg Arch.* 1999, **439**: 141-149
- Dychdala G.R.: Chlorine and chlorine compounds. In *Disinfection, Sterilisation and Preservation.* Lea und Febiger 1991, 131-151
- Ebadi M., Srinivasan S.K., Baxi M.D.: Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 1996, **48**: 1-19
- Engler R.L., Dahlgren M.D., Morris D.D., Peterson M.A., Schmid-Schonbein G.W.: Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol.* 1986, **251**: 314-323
- Erdmann E., Böhm M., Hanrath P., Meyer J., Steinbeck G.: *Krankheiten des Herzens, des Kreislaufes und der herznahen Gefäße. Klinische Kardiologie* 2000 (5. Auflage).
- Estell D.A., Graycar T.P., Wells J.A.: Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. 1985, *J Biol Chem.* **260**: 6518-6521
- Fan J.S., Jiang M., Dun W., McDonald T.V., Tseng G.N.: Effects of outer mouth mutations on hERG channel function: a comparison with similar mutations in the Shaker channel. *Biophys J.* 1999, **76**: 3128-3140
- Farrelly A.M., Ro S., Callaghan B.P., Khoyi M.A., Fleming N., Horowitz B., Sanders K.M., Keef K.D.: Expression and function of KCNH2 (HERG) in the human jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003, **284**: 883-895
- Fearon I.M., Palmer A.C.V., Balmforth A.J., Ball S.G., Varadi G., Peers C.: Hypoxic and redox inhibition of the human cardiac L-Type Ca²⁺ channel. *Adv Exp Med Biol.* 2000, **475**: 209-218

- Fernandez D., Ghanta A., Kinard K.I., Sanguinetti M.C.: Molecular mapping of a site for Cd^{2+} -induced modification of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channel activation. *J Physiol.* 2005, **567**: 737-755
- Ferrer T., Rupp J., Piper D.R., Tristani-Firouzi M.: The S4-S5 linker directly couples voltages sensor movement to the activation gate in the human ether-a-go-go-related gene (hERG) K^+ channel. *J Biol Chem.* 2006, **281**: 12858-12864
- Ficker E., Jarolimek W., Brown A.M.: Molecular determinants of inactivation and dofetilide block in ether a-go-go (EAG) channels and EAG-related K^+ channels. *Mol Pharmacol.* 2001, **60**: 1343-1348
- Ficker E., Jarolimek W., Kiehn J., Baumann A., Brown A.M.: Molecular determinants of dofetilide block of HERG K^+ channel. *Circ Res.* 1998, **82**: 386-395
- Finley M.R., Li Y., Hua F., Lillich J., Mitchell K.E., Ganta S., Gilmour R.F., Freeman L.C.: Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, **283**: H126-138
- Fontana L., D'Amico M., Crociani O., Biagiotti T., Solazzo M., Rosati B., Arcangeli A., Wanke E., Olivotto M.: Long-term modulation of HERG channel gating in hypoxia. *Biochem Biophys Research Commun.* 2001, **286**: 857-862
- Gabbita S.P., Aksenov M.Y., Lovell M.A., Markesbery W.R.: Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* 1999, **73**: 1660-1666
- Gessner G. and Heinemann S.H.: Inhibition of hEAG1 and hERG1 potassium channels by clofilium and its tertiary analogue LY97241. *Br J Pharmacol.* 2003, **138**: 161-171
- Giancotti F.G. and Ruoslahti E.: Integrin signaling. *Science* 1999, **285**: 1028-1032
- Good P.F., Werner P., Hsu A., Olanow C.W., Perl D.P.: Evidence of neuronal damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1996, **149**: 21-28
- Gopalakrishna R., Gundimeda U., Chen Z.H.: Cancer-preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in Ca^{2+} -dependent isoenzymes of protein kinase C. *Arch Biochem Biophys.* 1997, **348**: 25-36
- Griendling K.K and Alexander R.W.: Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997, **96**: 3264-3265
- Gnaiger E. and Kuznetsov A.V.: Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrom c. *Biochem Soc Trans.* 2002, **30**: 252-258
- Guizy M., Arias C., David M., González T., Valenzuela C.: {Omega}-3 and {omega}-6 polyunsaturated fatty acids block HERG channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005, **289**: 1251-1260
- Gutman G.A., Chandy K.G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stühmer W., Wang X.: International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005, **57**: 473-508
- Guzy R.D. and Schumacker P.T.: Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006, **91**: 807-819

- Haberland M.E., Fong D., Cheng L.: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988, **241**: 215-218
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. 2. Edition Oxford: Clarendon Press 1989, 22-85, 86-187
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sahmann B., Sigworth F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981, **391**: 85-100
- Han H., Wang J., Zhang Y., Long H., Wang H., Xu D., Wang Z.: HERG K⁺ channel conductance promotes H₂O₂-induced apoptosis in HEK293 cells: Cellular Mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 2004, **14**: 121-134
- Hardman R.M., Stansfeld P.J., Dalibalta S., Sutcliffe J.M., Mitcheson J.S.: Activation gating of hERG potassium channels: S6 glycines are not required as gating hinges. *J Biol Chem.* 2007, **282**: 31972-31981
- Harrison D.G.: Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol.* 1997, **20**: II-11- II-17
- Heginbothan L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R.: A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 1992, **258**: 1152-1155
- Heginbothan L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R., Heginbothan L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R.: Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J.* 1994, **66**: 1061-1067
- Heinemann S.H., Rettig J., Wunder F., Pongs O.: Molecular and functional characterization of a rat brain Kv β 3 potassium channel subunit. *FEBS Lett.* 1995, **377**: 383-389
- Herzberg I.M., Trudeau M.C., Robertson G.A.: Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J Physiol.* 1998, **511**: 3-14
- Hille B.: Ion channels of excitable membranes. 3. Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland. Massachusetts. 2001
- Hool L.C.: Differential regulation of the slow and rapid components of guinea-pig cardiac delayed rectifier K⁺ channels by hypoxia. *J Physiol.* 2004, **554**: 743-754
- Ide T., Tsutsui H., Kinugawa S., Suematsu N., Hayashidani S., Ichikawa K., Utsumi H., Machida Y., Egashira K., Takeshita A.: Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxid in the failing myocardium. *Circ Res.* 2000, **86**: 152- 157
- Jiang M., Zhang M., Maslennikov I.V., Liu J., Wu D.M., Korolkova Y.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tseng G.N.: Dynamic conformational changes of extracellular S5-P linkers in the hERG channel. *J Physiol.* 2005, **569**: 75-89
- Jiang M., Dun W., Tseng G.N.: Mechanism for the effects of extracellular acidification on HERG-channel function. *Am J Physiol Heart Physiol.* 1999, **277**: 1283-1292
- Jiang Y., Lee A., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.: The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002, **417**: 523-526
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.: Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002, **417**: 515-522

- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.: X-Ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003, **423**: 33-41
- Jiang QX., Wang DN, MacKinnon R.: Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 2004, **430**: 806-810
- Johnson J.P., Balser J.R., Bennett P.B.: A novel extracellular calcium sensing mechanism in voltage gated potassium ion channels. *J Neurosci.* 2001, **21**: 4143-4153
- Johnson D. and Travis J.: The oxidative inactivation of human α -1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem.* 1979, **254**: 4022-4026
- Jones E.M., Roti Roti E.C., Wang J., Delflosse S.A., Robertson G.A.: Cardiac I_{Kr} channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem.* 2004, **279**: 44690-44694
- Ju S., Lin L., Chein H.R., Hsu W.: Substitution of the critical methionine residues in trigonopsis variabilis D-amino-acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, **186**: 215-219
- Kagan A., Melman Y. F., Krumerman A., McDonald T.V.: 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J.* 2002, **21**: 1889-1898
- Kamb A., Iverson L.E., Tanouye M.A.: Molecular characterization of shaker, a drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* 1987, **50**: 405-413
- Kamiya K., Niwa R., Mitcheson J.S., Sanguinetti M.C.: Molecular determinants of HERG channel block. *Mol Pharmacol.* 2005, **69**: 1709-1716
- Karle C.A., Zitron E., Zhang W., Kathöfer S., Schoels W., Kiehn J.: Rapid component I_{Kr} of the guinea-pig cardiac delayed rectifier K⁺ current is inhibited by β (1)-adrenoreceptor activation, via cAMP/protein kinase A-dependent pathways. *Cardiovasc Res.* 2002, **53**: 355-362
- Kenyon G.L. and Bruice T.W.: Novel sulfhydryl reagents. *Methods Enzymol.* 1977, **47**: 407-430
- Kim Y.H., Berry A.H., Spencer D.S., Stites W.E.: Comparing the effects on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng.* 2001, **14**: 343-347
- Kinnaird A.A., Choy P.C., Man R.Y.: Lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart. *Lipids* 1988, **23**: 32-35
- Kourie J.I.: Interactions of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1998, **275**: 1-24
- Kuo A., Gulbis J.M., Antcliff J.F., Rahman T., Lowe E.D., Zimmer J., Cuthbertson J., Ashcroft F.M., Ezaki T., Doyle D.A.: Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003, **300**: 1922-1926
- Kurata H.T. and Fedida D.: A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006, **92**: 185-208
- Lameris T.W., de Zeeuw S., Alberts G., Boomsma F., Duncker D.J., Verdouw P.D., Man in't Veld A.J., van de Meiracker A.H.: Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* 2000, **101**: 2645-2650

- Larsen A.P., Olesen S.P., Grunnert M., Jespersen T.: Characterisation of hERG1a and hERG1b potassium channels- a possible role for hERG1b in the I_{Kr} current. *Eur J Physiol.* 2008, **456**: 1137-1148
- Lastraioli E., Guasti L., Crociani O., Polvani S., Hofmann G., Witchel H., Bencini L., Calistri M., Messerini L., Scatizzi M., Moretti R., Wanke E., Olivotto M., Mungnai G., Arcangeli A.: hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulated cell invasion of tumor cells. *Cancer Res.* 2004, **64**: 606-611
- Less-Miller J.P., Kondo C., Wang L., Duff H.J.: Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K^+ channel in mouse and human heart. *Circ Res.* 1997, **81**: 719-726
- Lees-Miller J.P., Duan Y., Teng G.Q., Duff H.J.: Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol.* 2000, **57**: 507-513
- Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E. R.: Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1996, **93**: 15036-15040
- Lii C.K., Chai Y.C., Zhao W., Thomas J.A., Hendrich S.: S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1994, **308**: 231-239
- Liu J., Zhang M., Jiang M., Tseng G.N.: Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol.* 2002, **120**: 723-737
- London B., Trudeau M.C., Newton K.P., Beyer K.P., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Satler C.A., Robertson G.A.: Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K^+ current. *Circ Res.* 1997, **81**: 870-878
- Lucas D.T. and Szveda L.I.: Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998, **95**: 510-514
- Luo S. and Levine R.L.: Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 2009, **23**: 464-472
- Lupoglazoff J.M., Denjoy I., Villan E., Fressart V., Simon F., Bozio A., Berthet M., Benammar N., Hainque B., Guicheney P.: Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol.* 2004, **43**: 826-830
- MacKinnon R.: Potassium channels. *FEBS Lett.* 2003, **555**: 62-65
- Man R.Y.: Lysophosphatidylcholine-induced arrhythmias and its accumulation in rat perfused heart. *Br J Pharmacol.* 1988, **93**: 412-416
- McDonald T.V., Yu Z., Ming Z., Palma E., Meyers M.B., Wang K.W., Goldstein S.A., Fishman G.I.: A mink-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr} . *Nature* 1997, **388**: 289-292
- Michelakis E.D., Thebaud B., Weir E.K., Archer S.L.: Hypoxic pulmonary vasoconstrictions: redox regulation of O_2 -sensitive K^+ channels by a mitochondrial O_2 -sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004, **37**: 1119-1136

- Miller C.: An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 2000, **4**: reviews 0004.1-000.45
- Miranda P., Manso D., Barros F., Carretero L., Hughes T.E., Alonso-Ron C., Doninguez P., Pena P.: FRET with multiply labeled HERG K⁺ channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains. *Biochim Biophys Acta.* doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.099
- Mitcheson J.S., Chen J., Lin M., Culbertson C., Sanguinetti M.C.: A structural basis for the drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000, **97**: 12329-12333
- Mitcheson J.S., Chen J., Sanguinetti M.C.: Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol.* 2000, **115**: 220-240
- Morais-Cabral J.H., Lee A., Cohen S.L., Chait B.T., Li M., MacKinnon R.: Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 1998, **95**: 649-655
- Murphy E. and Steenbergen C.: Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008, **88**: 581-609
- Nanduri J., Wang N., Bergson P., Yuan G., Ficker E., Prabhakar N.: Mitochondrial reactive oxygen species mediate hypoxic down-regulation of hERG channel protein. *Biochem Biophys Research Commun.* 2008, **373**: 309-314
- Neher E. und Sakmann B.: Single-channel currents recorded from the membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976, **260**: 799-802
- Nohl H.: A novel superoxide radical generator in the heart mitochondria. *FEBS Lett.* 1987, **214**: 269-273
- Opie L. H. and Clusin W.T.: Cellular mechanism for ischemic ventricular arrhythmias. *Annu Rev Med.* 1990, **41**: 231-238
- Orchard C.H. and Kentish J.C.: Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1990, **258**: C967-981
- Overholt J.L., Ficker E., Yang T., Shams H., Bright G.R., Prabhakar N.R.: HERG-like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol.* 2000, **83**: 1150-1170
- Palmer R.M., Ahston D.S., Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988, **333**: 664-666
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, **327**: 524-526
- Pannaccione A., Castaldo P., Ficker E., Annunziato L., Tagliatela M.: Histidines 578 and 587 in the S5-S6 linker of the human *Ether-a-gogo Related Gene-1* K⁺ channels confer sensitivity to reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2002, **227**: 8912-8919
- Papaharalambus C.A. and Griendling K.K.: Basic mechanism of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2007, **17**: 48-54
- Papazian D.M., Schwarz T.L., Tempel B.L., Jan Y.N., Jan L.Y.: Cloning of genomic and complementary DNA from shaker, a putative potassium channel gene from drosophila. *Science* 1987, **237**: 749-753

- Pardo-López L., Garcia-Valdés J., Gurrola G.B., Robertson G.A., Possani L.D.: Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Lett.* 2002, **510**: 45-49
- Patel A.J. and Honoré E.: Properties and modulation of mammalian 2P domain K^+ channels. *Trends Neurosci.* **24**: 339-346
- Peskin A.V. and Winterbourn C.C.: Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med.* 2001, **30**: 572-579
- Phartiyal P., Jones E.M.C., Robertson G.A.: Heteromeric assembly of human ether-a-go-go-related gene (hERG) 1a/1b channels occurs cotranslationally via N-terminal Interactions. *J Biol Chem.* 2007, **282**: 9874-9882
- Picot C.R., Petropoulos I., Perichon M., Moreau M., Nizard C., Friquet B.: Overexpression of MsrA protects WI-38 SV40 fibroblasts against H_2O_2 -mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2005, **39**: 1332-1341
- Piper D.R., Sanguinetti M.C., Tristani-Firouzi M.: Voltage sensor movement in the hERG K^+ channel. *Novartis Found Symp.* 2005, **266**: 46-52
- Ponting C.P. and Aravind L.: PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol.* 1997, **7**: R674-676
- Pourrier M., Schram G., Nattel S.: Properties, expression and potential roles of cardiac K^+ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol.* 2003, **194**: 141-152
- Priori S.G., Napolitano C., Paganini V., Cantù F., Schwartz P.J.: Molecular biology of the long QT syndrome: impact on management. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 1997, **20**: 2052-2057
- Reimann F. and Ashcroft F.M.: Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol.* 1999, **11**: 503-508
- Robertson G.A., Jones E.M.C., Wang J.: Gating and assembly of heteromeric hERG1a/1b channels underlying I_{Kr} in the heart. *Novartis Found Symp.* 2005, **266**: 4-15
- Rosati B., Rocchetti M., Zaza A., Wanke E.: Sulfonylureas blockade of neuronal and cardiac HERG channels. *FEBS Lett.* 1998, **440**: 125-130
- Rosenberg S., Barr P.J., Najarian R.C., Hallewell R.A.: Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α -antitrypsin. *Nature* 1984, **312**: 77-80
- Ruppersberg J.P., Stocker M., Pongs O., Heinemann S.H., Frank R., Koenen M.: Regulation of fast inactivation of cloned mammalian $I_{K(A)}$ channels by cysteine oxidation. *Nature* 1991, **352**: 711-714
- Sanchez-Chapula J.A., Navarro-Polanco R.A., Culbertson C., Chen J., Sanguinetti M.C.: Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K^+ channel block. *J Biol Chem.* 2002, **26**: 23587-23595
- Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E., Keating M.T.: A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: hERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995, **81**: 299-307
- Sanguinetti M.C. and Trisitani-Firouzi M.: hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006, **440**: 463-469

- Santarelli L.C., Wassef R., Heinemann S.H., Hoshi T.: Three methionine residues located within the regulator of conductance for K⁺ (RCK) domains confer oxidative sensitivity to large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Physiol.* 2006, **571**: 329-348
- Schafer F.Q. and Buettner G.R.: Redox environment of the cell viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001, **30**: 1191-1212
- Schlieff T., Schoenherr R., Heinemann S.H.: Modification of C-type inactivating Shaker potassium channels by chlormaine-T. *Pflüg Arch.* 1996, **431**: 483-493
- Schiemann G. and Novak P.: Über die Oxydationswirkung von Chlormamin-T. *Zeitschrift für angewandte Chemie der Technischen Hochschule Hannover.* 1927, Seite 1032-1033
- Schönherr R. and Heinemann S.H.: Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol.* 1996, **493**: 635-642
- Scholz E.P., Zitron E., Kiesecker C., Lueck S., Kathöfer S., Thomas D., Weretka S., Peth S., Kreve V.A., Schoels W., Katus H.A., Kiehn J., Karle C.A.: Drug binding to a aromatic residues in the HERG channel pore cavity as possible explanation for acquired Long QT syndrome by antiparkinsonian drug budipine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003, **368**: 404-414
- Schraufstatter, I. U., Browne K., Harris A., Hyslop P.A., Jackson J.H., Quehenberger O., Cochrane C.G.: Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest.* 1990, **85**: 554-562.
- Schwarz J.R., Bauer C.K.: Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med.* 2004, **8**: 22-30
- Seoh S.A., Sigg D., Papazian D.M., Bezanilla F.: Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the shaker K⁺ channel. *Neuron* 1996, **16**: 1159-1167
- Shacter E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews.* 2000, **32**:307-326
- Sharov V.S., Ferrington D.A., Squier T.C., Schöneich C.: Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* 1999, **455**: 247-250
- Sharov V.S. and Schöneich C.: Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic Biol Med.* 2000, **29**: 986-994
- Shechter Y., Burstein Y., Patchornik A.: Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry* 1975, **14**: 4497-4503
- Shi W.M., Wymore R.S., Wang H.S., Pan Z.M., Cohen I.S., McKinnon D., Dixon J.E.: Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *J Neurosci.* 1997, **17**: 9423-9432
- Singal P.K., Khaper N., Palace V., Kumar D.: The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res.* 1998, **40**: 426-432
- Sigworth F.J.: Electronic design of the patch-clamp. In single-channel recordings. 2. Aufl., Plenum Press 1995, 95-127

- Smith P.L., Baukrowitz T., Yellen G.: The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996, **379**: 833-836
- Smith C.V., Jones D.P., Guenther T.M., Lash L.H., Lauterburg B.H.: Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996, **140**: 1-12
- Smith P.L., Yellen G.: Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J Gen Physiol.* 2002, **119**: 275-293
- Splawski I., Shen J., Timothy K.W., Lehmann M.H., Priori S., Robinson J.L., Moss A.J., Schwartz P.J., Towbin J.A., Vincent G.M., Keating M.T.: Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes, KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000, **102**: 1178-1185
- Steinbrecher U.P., Zhang H.F., Loughheed M.: Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 1990, **9**: 155-168
- Stephens G.J., Owen D.G., Robertson B.: Cysteine-modifying reagents alter the gating of the rat cloned potassium channel Kv1.4. *Pflug Arch.* 1996, **431**: 435-442
- Stief T.W.: The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses.* 2003, **60**: 567-572
- Suessbrich H., Schönherr R., Heinemann S.H., Attali B., Lang F., Busch A.E.: The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol.* 1997, **120**: 968-974
- Suessbrich H., Waldegge S., Lang F., Busch A.E.: Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett.* 1996, **385**: 77-80
- Su Z., Limberis J., Martin R.L., Xu R., Kolbe K., Heinemann S.H., Hoshi T., Cox B.F., Gintant G.A.: Functional consequences of methionine oxidation of hERG potassium channels. *Biochem Pharmacol.* 2007, **74**: 702-711
- Sun H., Gao J., Ferrington D.A., Biesiada H., Williams T.D., Squier T.C.: Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 1999, **38**: 105-112
- Taglialatela M., Castaldo P., Iossa S., Pannaccione A., Fresi A., Ficker E., Annunziato L.: Regulation of the human ether-a-gogo related gene (HERG) K⁺ channels by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1997, **94**: 11698-11703
- Tang X.D., Santarelli L.C., Heinemann S.H., Hoshi T.: Metabolic regulation of potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 2004, **66**: 131-159
- Thomas D., Karle C.A., Kiehn J.: The cardiac hERG/I_{Kr} potassium channels as pharmacological targets: structure, function, regulation, and clinical applications. *Curr Pharm Des.* 2006, **12**: 2271-2283
- Thomas D., Kiehn J., Katus H.A., Karle C.A.: Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, I_{Kr}, and the underlying hERG ion channel. *Basic Res Cardiol.* 2004, **99**: 279-287
- Thomas J.A., Poland B., Honzatko R.: Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys.* 1995, **319**: 1-9

- Torres A.M., Bansal P.S., Sunde M., Clarke C.E., Bursill J.A., Smith D.J., Bauskin A., Breit S.N., Campbell T.J., Alewood P.F., Kuchel P.W., Vandenberg J.I.: Structure of the HERG K⁺ channel S5P extracellular linker: role of an amphiphatic α -helix in C-type inactivation. *J Biol Chem.* 2003, **278**: 42136-42148
- Tristani-Firouzi M., Chen J., Sanguinetti M.C.: Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J Biol Chem.* 2002, **277**: 18994-19000
- Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B., Robertson G.A.: HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 1995, **269**: 92-95
- Tseng G.N.: I_{Kr}: the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, **33**: 835-849
- Turrens J.F., Beconi M., Barilla J., Chavez U.B., McCord J.M.: Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun.* 1991, **12-13**: 681-689
- Um S.Y. and McDonald T.V.: Differential associations between HERG and KCNE1 or KCNE2. *PloS ONE* 2007, **2**: e933
- Vandenberg J.I., Torres A.M., Campbell T.J., Kuchel P.W.: The HERG K⁺ channel: progress in understanding the molecular basics of its unusual gating kinetics. *Eur Biophys J.* 2004, **33**: 89-97
- Vanden Hoek T.L., Li C., Shao Z., Schumacker P.T., Becker L.B.: Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, **29**: 2571-2583
- Veglio M., Chinaglia A., Cavallo-Perin P.: QT interval, cardiovascular risk factors and risk of death in diabetes. *J Endocrinol Invest.* 2004, **27**: 175-181
- Ward C.A. and Moffat M.P.: Role of Protein kinase C in mediating effects of hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1995, **27**: 1089-1097
- Wang H., Zhang Y., Cao L., Han H., Wang J., Yang B., Nattel S., Wang Z.: HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res.* 2002, **62**: 4843-4848
- Wang J., Trudeau M.C., Zappia M., Robertson G.A.: Regulation of deactivation by an amino terminal domain in *human ether-a-go-go-related gene* potassium channels. *J Gen Physiol.* 1998, **112**: 637-647
- Wang J., Wang H., Han H., Zhang Y., Yang B., Nattel S., Wang Z.: Phospholipid metabolite 1-palmitoyl-lysophosphatidylcholine enhances human ether-a-go-go-related (HERG) K⁺ channel function. *Circulation* 2001, **104**: 2645-2648
- Wang J., Zhang Y., Wang H., Han H., Nattel S., Yang B., Wang Z.: Potential mechanisms for the enhancement of HERG K⁺ channel function by phospholipid metabolites. *Br J Pharmacol.* 2004, **141**: 586-599
- Warmke J.W. and Ganetzky B.: A family of potassium channel genes related to eag in drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994, **91**: 3438-3442
- Weerapura M., Nattel S., Chartier D., Caballero R., Hebert T.E.: A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier currents. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol.* 2002, **540**: 15-27

- Weir E.K and Archer S.L.: The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* 1995, **9**: 183-189
- Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M.: Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest.* 1982, **70**: 598-607
- Weissbach L., Resnick L., Brot N.: Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 2005, **1703**: 203-217
- Witztum J.L. and Steinberg D.: Role of oxidized low density lipoprotein in arterogenesis. *J Clin Invest.* 1991, **88**: 1785-1792
- Wold L.E., Ceylan-Isik A.F., Ren J.: Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* 2005, **26**: 908-917
- Wu S.N., Lo Y.K., Kuo B.I.T., Chiang H.T.: Ceramide inhibits the inwardly rectifying potassium current in GH3 lactotrophs. *Endocrinology* 2001, **142**: 4785-4794
- Xu C.Q., Zhu S.Y., Chi C.W., Tytgat J.: Turret and pore block of K⁺ channels: what is the difference? *Trends Pharmacol Sci.* 2003, **24**: 446-448
- Yifrach O. and MacKinnon R.: Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell* 2002, **111**: 231-239
- Zagotta W.N., Olivier N.B., Black K.D., Young E.C., Olson R., Gouaux E.: Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Lett Nature.* 2003, **425**: 201-205
- Zeidner G., Sadja R., Reuveny E.: Redox-dependent gating of G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem.* 2001, **276**: 35564-35570
- Zhang G. and Horrigan F.T.: Cysteine modification alters voltage- and Ca²⁺-dependent gating of large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol.* 2005, **125**: 213-226
- Zhang Y., Wang J., Wang H., Yang B., Wang Z.: Impairment of HERG (Human ether-a-go-go Related Gene) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia: similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem.* 2003, **278**: 10417-10426
- Zhang Y., Xiao J., Wang H., Luo X., Wang J., Villeneuve L.R., Zhang H., Bai Y., Yang B., Wang Z.: Restoring depressed HERG K⁺ channel functions as a mechanism for insulin treatment of the abnormal QT prolongation and the associated arrhythmias in diabetic rabbits. *Am J Physiol.* 2006, **291**: 1446-1455
- Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R.: Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 2001, **414**: 43-48
- Zhou Z., Gong Q., Ye B., Fan Z., Makielski J.C., Robertson G.A., January C.T.: Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J.* 1998, **74**: 230-241

Anhang

Tabelle A-1: Übersicht aller für die *QuikChange*-Methode verwendeten *primer*

Mutation	Nummer	primer-Sequenz
M462L	2277	5' -GTGGACATCCTGTTTCATTGTGGAC- 3'
	2278	5' -GTCCACAATGAACAGGATGTCCAC- 3'
M502L	2275	5' -CTCATCGACCTGGTGGCCGCC- 3'
	2276	5' -GGCGGCCACCAGGTCGATGAG- 3'
M554L	2123	5' -GTGCTGTTCTTGCTCCTGTGCACC- 3'
	2124	5' -AGGTGCACAGGAGCAAGAACAGCAC- 3'
M574L	2273	5' -ATCGGCAACCTGGAGCAGCCA- 3'
	2274	5' -TGGCTGCTCCAGGTTGCCGAT- 3'
M579L	2271	5' -CCACACCTGGACTCACGCATCG- 3'
	2272	5' -CGATGCGTGAGTCCAGGTGTGG- 3'
M645L	2087	5' -GATCTTCTCCATCTGCGTCCTGCTC- 3'
	2088	5' -GAGCAGGACGCAGATGGAGAAGATC- 3'
M651L	2089	5' -GCTCCCTCCTGTATGCTAGCATCTTC- 3'
	2090	5' -GAAGATGCTAGCATACAGGAGGGAGC- 3'
M677L	2125	5' -CTACCACACACAGCTGCTGCGGGTG- 3'
	2126	5' -CACCCGCAGCAGCTGTGTGTGGTAG- 3'
M713L	2093	5' -TCGACCTGAACGGGGCGGTGCTGAA- 3'
	2094	5' -CCCTTCAGCACCGCGTTCAGGTCGA- 3'
M756L	2095	5' -GCCCTGGCCCTGAAGTTCAAGACC- 3'
	2096	5' -TGGTCTTGAAC TTCAGGGCCAGGGC- 3'
M844L	2097	5' -GTGCTGGACCTGTACCCTGAGTTC- 3'
	2098	5' -GGACTCAGGGTACAGTGCCAGCAC- 3'
H578D/H587Y	2221	5' -ATGGAGCAGCCAGACATGGAC- 3'
	2222	5' -GTCCATGTCTGGCTGCTCCAT- 3'
	2223	5' -GGCTGGCTGTACAACCTGGGCGAC- 3'
	2224	5' -GTCGCCCAGGTTGTACAGCCAGCC- 3'
C723S	2290	5' -TTCCCTGAGTCCCTGCAGGCT- 3'
	2291	5' -AGCCTGCAGGGACTCAGGGAA- 3'
C729S	2293	5' -GACATCTCCCTGCACCTGAACC- 3'
	2294	5' -GGTTCAGGTGCAGGGAGATGTC- 3'
C740S	2295	5' -CTGCAGCACTCCAAACCCTTCC- 3'
	2296	5' -GGAAGGGTTTGGAGTGCTGCAG- 3'
C750S	2297	5' -ACCAAGGGCTCCCTTCGGGCC- 3'
	2298	5' -GGGCCC GAAGGGAGCCCTTG GT- 3'
C828S	2315	5' -GCCCTCACCTACAGTGACCTACACAAGATCC- 3'
	2316	5' -GGATCTTGTGTAGGTCAGTGTAGGTGAGGGC- 3'

Tabelle A-2: Übersicht aller für die *two-step*-Methode verwendeten *primer*

Mutation	Nummer	Sequenz der Mutagenese- <i>primer</i>
C39S	2465	5' -GCTCGGGTGGAGAACTCCGCCGTCATCTACTGC-3'
	2466	5' -GCAGTAGATGACGGCGGAGTTCTCCACCCGAGC-3'
C44S	2467	5' -TGCGCCGTCATCTACTCCACCGACGGCTTCTGC-3'
	2468	5' -GCAGAAGCCGTCGTTGGAGTAGATGACGGCGCA-3'
C49S	2469	5' -TGCAACGACGGCTTCTCCGAGCTGTGCGGCTAC-3'
	2470	5' -GTAGCCGCACAGCTCGGAGAAGCCGTCGTTGCA-3'
C52S	2471	5' -GGCTTCTGCGAGCTGTCCGGCTACTCGCGGGCC-3'
	2472	5' -GGCCCGCGAGTAGCCGGACAGCTCGCAGAAGCC-3'
C64S	2475	5' -GTGATGCAGCGACCCTCCACCTGCGACTTCCTG-3'
	2476	5' -CAGGAAGTCGCAGGTGGAGGGTCGCTGCATCAC-3'
C66S	2477	5' -CAGCGACCCTGCACCTCCGACTTCCTGCACGGG-3'
	2478	5' -CCCGTGCAGGAAGTCGGAGGTGCAGGGTGCCTG-3'
C105S	2481	5' -CGGAAAGATGGGAGCTCCTTCCTATGTCTGGTG-3'
	2482	5' -CACCAGACATAGGAAGGAGCTCCCATCTTTCCG-3'
C108S	2483	5' -GGGAGCTGCTTCCTATCTCTGGTGGATGTGGTG-3'
	2484	5' -CACCACATCCACCAGAGATAGGAAGCAGCTCCC-3'
C265S/C276S	2487	5' -GCCTCGGGCTCCAGCTCCAGCCTGGCCCGGACG-3'
	2488	5' -CGTCCGGGCCAGGCTGGAGCTGGAGCCCGAGGC-3'
	2489	5' -CGCTCCCGAGAAAGCTCCGCCAGCGTGCGCCGC-3'
	2490	5' -GCGGCGCACGCTGGCGGAGCTTTCTCGGGAGCG-3'

Tabelle A-3: Biophysikalische Charakterisierung von Y652A-hERG und F656A-hERG (*P<0.05)

		WT			Y652A			(N)	F656A			(N)
Aktivierung	V _h (mV)	-3.2	±	1.2	-1.9	±	2.8	(7)	-7.9	±	2.0	(7)
	k _h (mV)	9.7	±	0.2	10.6	±	0.1	(7)	9.6	±	0.7	(7)
	τ _{akt} (ms)	201.9	±	13.5	241.4	±	26.3	(6)	235.0	±	44.4	(5)
Deaktivierung	-145 mV	21.3	±	0.8	15.3	±	1.1*	(5)	22.8	±	1.0	(5)
	-120 mV	36.7	±	1.1	24.8	±	1.3*	(5)	44.2	±	1.9*	(5)
	-95 mV	74.6	±	3.2	50.1	±	3.3*	(5)	79.3	±	1.9	(5)
Inaktivierung	55 mV	10.1	±	0.3	6.6	±	0.2*	(5)	7.1	±	0.3*	(8)
	30 mV	13.9	±	0.3	8.7	±	0.2*	(5)	8.6	±	0.4*	(8)
	5 mV	16.6	±	0.3	10.1	±	0.3*	(5)	9.1	±	0.5*	(8)
Rückkehr aus der Inaktivierung	V _h (mV)	-84.2	±	1.0	-62.5	±	2.5*	(5)	-115.0	±	1.0*	(5)
	k _h (mV)	15.7	±	0.5	15.8	±	0.8	(5)	18.3	±	0.4*	(5)

Tabelle A-4: Biophysikalische Charakterisierung von H578D/H587Y-hERG (*P<0.05)

		WT			H578D/H587Y			(N)
Aktivierung	V _h (mV)	-3.2	±	1.2	0.5	±	1.6	(9)
	k _h (mV)	9.7	±	0.2	9.7	±	0.2	(9)
	τ _{akt} (ms)	201.9	±	13.5	266.3	±	15.6*	(9)
Deaktivierung	-145 mV	21.3	±	0.8	22.7	±	1.16	(5)
	-120 mV	36.7	±	1.1	39.3	±	2.5	(5)
	-95 mV	74.6	±	3.2	74.3	±	3.0	(5)
Inaktivierung	55 mV	10.1	±	0.3	9.3	±	0.3	(7)
	30 mV	13.9	±	0.3	12.5	±	0.7	(7)
	5 mV	16.6	±	0.3	15.5	±	0.5	(7)
Rückkehr aus der Inaktivierung	V _h (mV)	-84.2	±	1.0	-91.6	±	1.4*	(7)
	k _h (mV)	15.7	±	0.5	18.6	±	1.6*	(7)

Tabelle A-5: Analyse der Kanalaktivierung aller Met-Mutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/Δ2N)

		Aktivierung							
	Kanal	V_h (mV)		k_h (mV)		(N)	τ_{akt} (ms)		(N)
	WT	-3.2	± 1.2	9.7	± 0.2	(30)	201.9	± 13.5	(25)
Deletions- mutanten	ΔN	-9.7	± 3.6	10.3	± 0.9	(9)	92.8	± 20.8*	(7)
	dΔC	8.7	± 4.5*	10.4	± 0.6	(8)	379.4	± 51.4*	(6)
Einzel- mutanten	M462L	-11.7	± 2.4*	8.5	± 0.3*	(7)	145.7	± 16.3*	(5)
	M502L	-1.0	± 1.5	8.6	± 0.2*	(6)	189.0	± 22.7	(5)
	M554L	-10.6	± 1.5*	8.9	± 0.3	(13)	149.0	± 9.5*	(8)
	M574L	-2.4	± 1.5	9.9	± 0.2	(8)	177.6	± 9.1	(8)
	M579L	-0.7	± 2.9	9.2	± 0.5	(6)	183.5	± 26.3	(9)
	M645L	-5.7	± 3.3	10.7	± 1.1	(5)	170.1	± 36.4	(5)
	M651L	-2.5	± 2.8	10.4	± 0.5	(8)	254.0	± 48.1	(8)
	M677L	-0.2	± 2.7	10.4	± 0.7	(8)	217.0	± 16.8	(6)
	M713L	-19.8	± 1.4*	8.4	± 0.2*	(10)	111.8	± 9.5*	(9)
	M756L	-8.1	± 1.8	9.3	± 0.5	(11)	179.8	± 11.1	(5)
	M844L	-2.1	± 3.3	9.1	± 0.4	(6)	174.5	± 20.2	(6)
Kombinations- mutanten	3Met	-27.7	± 1.4*	8.8	± 0.3*	(8)	60.0	± 3.0*	(11)
	ΔN/3Met	-32.8	± 2.3*	7.8	± 0.8*	(8)	72.0	± 8.9	(6)

Tabelle A-6: Analyse der Deaktivierung aller Met-Mutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/Δ2N)

		Deaktivierung (τ_{deakt})					
	Kanal	-145 mV		-120 mV		-95 mV	(N)
	WT	21.5	± 0.8	36.7	± 1.1	74.6 ± 3.2	(26-29)
Deletions- mutanten	ΔN	14.7	± 0.6 ^{1*}	17.9	± 0.4 ^{1*}	26.1 ± 2.5 ^{1*}	(6)
	dΔC	21.8	± 1.6 ¹	31.6	± 1.7 ^{1*}	78.1 ± 7.3 ¹	(5)
Einzel- mutanten	M462L	23.2	± 1.1	42.3	± 1.4*	87.1 ± 4.1*	(7)
	M502L	21.7	± 1.2	36.1	± 2.3	64.9 ± 5.1	(7-8)
	M554L	23.6	± 1.1	52.1	± 1.6*	144.9 ± 14.8*	(6)
	M574L	25.9	± 1.9*	43.9	± 2.3*	89.2 ± 5.2*	(8-9)
	M579L	22.5	± 2.5	42.3	± 3.3	81.4 ± 3.7	(5-6)
	M645L	28.5	± 0.8*	54.3	± 3.5*	196.9 ± 27.3*	(5)
	M651L	29.4	± 2.2*	54.8	± 3.0*	133.0 ± 8.2*	(5)
	M677L	21.1	± 1.2	30.7	± 0.9*	67.9 ± 2.8	(5-9)
	M713L	22.9	± 0.6	37.7	± 1.6	80.0 ± 3.7	(6)
	M756L	23.4	± 1.9	43.0	± 3.8	83.8 ± 8.6	(5)
	M844L	18.9	± 0.5*	33.1	± 1.1*	69.6 ± 3.9	(6)
Kombinations- mutanten	3Met	24.2	± 0.6*	51.1	± 2.4*	141.1 ± 5.7*	(6)
	ΔN/3Met	14.5	± 0.8 ¹	21.5	± 0.1 ^{1*}	46.1 ± 2.2 ^{1*}	(6)

Tabelle A-7: Analyse der Inaktivierung aller Met-Mutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/Δ2N)

Inaktivierung (τ_{inakt})											
	Kanal	55 mV			30 mV			5 mV			(N)
	WT	10.1	±	0.3	13.9	±	0.3	16.6	±	0.3	(24)
Deletions- mutanten	ΔN	11.8	±	0.7 ¹	15.0	±	0.7 ^{1*}	17.3	±	1.3 ¹	(6)
	dΔC	7.1	±	0.5 ^{1*}	12.1	±	0.5 ^{1*}	15.8	±	0.8 ¹	(5)
Einzel- mutanten	M462L	10.5	±	0.6	15.4	±	0.7	17.8	±	0.4	(7)
	M502L	10.4	±	0.7	15.2	±	0.6	19.3	±	0.9	(6)
	M554L	9.8	±	0.4	14.6	±	0.5	17.9	±	0.4*	(7)
	M574L	11.5	±	0.4*	15.2	±	0.4*	17.8	±	0.7	(8)
	M579L	13.9	±	1.0*	19.9	±	1.7*	23.6	±	1.2*	(5)
	M645L	0.65	±	0.05 ^{2*}	0.80	±	0.06 ^{2*}	1.1	±	0.06 ^{2*}	(6)
	M651L	14.5	±	0.3*	19.6	±	0.5*	23.4	±	0.5*	(5)
	M677L	9.9	±	0.8	14.1	±	0.6	18.0	±	0.1	(8)
	M713L	12.2	±	0.4*	15.9	±	0.5*	18.9	±	0.6*	(6)
	M756L	9.4	±	0.8	13.4	±	0.6	16.5	±	0.4	(5)
	M844L	10.2	±	0.2	13.5	±	0.3	16.2	±	0.5	(6)
Kombinations- mutanten	3Met	11.9	±	1.2	16.1	±	0.4*	19.2	±	0.4*	(6)
	ΔN/3Met	13.3	±	0.2 ^{1*}	17.6*	±	0.5 ^{1*}	18.8	±	0.5 ¹	(6)

Tabelle A-8: Analyse der Rückkehr aus der Inaktivierung aller Met-Mutanten (*P<0.05/WT), (*P<0.05/Δ2N)

Rückkehr aus der Inaktivierung								
	Kanal	V_{h_inakt} (mV)			k_{h_inakt} (mV)			(N)
	WT	-84.2	±	1.0	15.7	±	0.5	(28)
Deletions- mutanten	ΔN	-81.2	±	2.6 ¹	21.6	±	1.2 ^{1*}	(11)
	dΔC	-118.8	±	4.1 ^{1*}	21.4	±	4.0 ¹	(5)
Einzel- mutanten	M462L	-90.2	±	1.3	14.0	±	1.1	(5)
	M502L	-83.7	±	2.0	16.0	±	1.0	(5)
	M554L	-67.3	±	2.0*	15.9	±	1.5	(7)
	M574L	-91.6	±	1.8*	16.5	±	1.3	(8)
	M579L	-88.3	±	2.9	15.8	±	1.4	(7)
	M645L	-113.4	±	3.4 ^{2*}	15.5	±	1.6 ²	(6)
	M651L	-83.9	±	1.9	16.5	±	1.9	(7)
	M677L	-78.7	±	1.9	14.8	±	0.7	(5)
	M713L	-81.8	±	1.5	18.8	±	0.8*	(6)
	M756L	-83.6	±	2.1	17.1	±	1.2	(5)
	M844L	-78.4	±	1.4*	18.2	±	0.5*	(6)
Kombinations- mutanten	3Met	-76.1	±	0.8*	21.7	±	0.5*	(6)
	ΔN/3Met	-91.4	±	1.7 ^{1*}	23.0	±	0.5 ¹	(6)

Tabelle A-9: Analyse der Kanalaktivierung der 5 Cys- und Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/ Δ 2N)

		Aktivierung									
	Kanal	V_h (mV)		k_h (mV)		(N)	τ_{akt} (ms)		(N)		
Einzel-mutanten	WT	-3.2	± 1.2	9.7	± 0.2	(30)	201.9	± 13.5	(25)		
	C723S	-27.9	± 1.8*	6.8	± 0.4*	(7)	83.1	± 23.2*	(7)		
	C729S	-1.2	± 2.1	9.0	± 0.1*	(11)	192.2	± 20.6	(6)		
	C740S	-11.5	± 1.8*	8.9	± 0.2	(7)	156.0	± 14.4*	(6)		
	C750S	2.7	± 1.6	9.1	± 0.2	(6)	263.4	± 17.1*	(5)		
Kombinations-mutanten	C828S	2.0	± 2.0	9.6	± 0.5	(5)	217.6	± 24.9	(7)		
	3Cys	-18.6	± 2.8*	8.5	± 0.6	(9)	91.5	± 8.4*	(9)		
	10Cys	-13.4	± 2.3*	7.8	± 0.9*	(7)	82.9	± 9.2*	(8)		
	ΔN	-9.7	± 3.6	10.3	± 0.9	(9)	130.3	± 34.9	(7)		
	ΔN/3Cys	0.0	± 5.6	14.7	± 1.2*	(12)	135.7	± 29.5	(6)		
	ΔN/C723S	-16.8	± 2.9*	11.7	± 0.8	(7)	128.2	± 19.4	(7)		
	Δ(2-15)/C723S	-27.2	± 1.8*	7.3	± 0.3*	(7)	82.1	± 7.8*	(6)		

Tabelle A-10: Analyse der Deaktivierung der 5 Cys- und Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/ Δ 2N)

		Deaktivierung (τ_{deakt})						
	Kanal	<u>-145 mV</u>		<u>-120 mV</u>		<u>-95 mV</u>		<u>(N)</u>
Einzel- mutanten	WT	21.5	± 0.8	36.7	± 1.1	74.6	± 3.2	(26-29)
	C723S	19.3	± 1.3	30.7	± 2.3*	55.8	± 1.4*	(5)
	C729S	23.9	± 0.9	33.9	± 1.6	60.2	± 1.8*	(7)
	C740S	25.5	± 0.6*	44.7	± 1.5*	79.0	± 4.2	(6)
	C750S	19.8	± 1.6	33.4	± 2.0	67.5	± 5.6	(5)
Kombinations- mutanten	C828S	23.3	± 0.8	37.7	± 1.3	74.6	± 4.6	(6)
	3Cys	17.9	± 0.9 ^{1*}	25.0	± 0.9 ^{1*}	48.1	± 2.5 ^{1*}	(5)
	10Cys	14.2	± 1.3 ^{1*}	23.8	± 0.6 ^{1*}	34.9	± 2.3 ^{1*}	(4)
	ΔN	14.7	± 0.6 ¹	17.9	± 0.4 ¹	26.1	± 2.5 ¹	(6)
	ΔN/3Cys	9.8	± 0.3 ^{1*}	14.2	± 0.5 ^{1*}	21.0	± 1.0 ^{1*}	(8)
	ΔN/C723S	14.9	± 0.9 ¹	18.4	± 1.4 ¹	28.4	± 1.4 ¹	(6)
	Δ(2-15)/C723S	15.2	± 1.1	24.0	± 0.8*	44.0	± 1.9*	(5)

Tabelle A-11: Analyse der Inaktivierung der 5 Cys- und Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/Δ2N)

		Inaktivierung (τ_{inakt})						
	Kanal	55 mV		30 mV		5 mV		(N)
Einzel-mutanten	WT	10.1	\pm 0.3	13.9	\pm 0.3	16.6	\pm 0.3	(24)
	C723S	10.3	\pm 1.5	12.2	\pm 1.1	18.7	\pm 0.9	(5)
	C729S	9.8	\pm 0.4	13.3	\pm 0.4	16.3	\pm 0.5	(6)
	C740S	12.1	\pm 0.4*	16.7	\pm 0.5*	20.1	\pm 0.6*	(6)
	C750S	12.0	\pm 0.7*	16.0	\pm 0.6*	18.2	\pm 0.5*	(4)
Kombinations-mutanten	C828S	11.9	\pm 0.3*	15.5	\pm 0.3*	18.4	\pm 0.3*	(6)
	3Cys	7.7	\pm 0.7 ¹ *	11.1	\pm 0.5 ¹ *	14.8	\pm 0.4 ¹ *	(5)
	10Cys	11.0	\pm 0.7 ¹	18.8	\pm 1.1 ¹ *	-		(4)
	ΔN	11.8	\pm 0.7¹	15.7	\pm 0.7¹	17.3	\pm 1.3¹	(6)
	ΔN/3Cys	11.6	\pm 0.5 ¹	15.7	\pm 0.6 ¹	18.4	\pm 1.2 ¹	(6)
	ΔN/C723S	12.9	\pm 0.7 ¹	18.1	\pm 0.7 ¹ *	20.7	\pm 0.7 ¹ *	(6)
	Δ(2-15)/C723S	15.3	\pm 1.8	22.8	\pm 1.2*	25.8	\pm 0.8*	(5)

Tabelle A-12: Rückkehr aus der Inaktivierung der 5 Cys- und Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/Δ2N)

Rückkehr aus der Inaktivierung							
	Kanal	V_{h_inakt} (mV)		k_{h_inakt} (mV)		(N)	
Einzel-mutanten	WT	-84.2	± 1.0	15.7	± 0.5	(28)	
	C723S	-80.0	± 3.2	18.3	± 1.6	(5)	
	C729S	-80.0	± 1.4	15.7	± 0.8	(6)	
	C740S	-89.9	± 2.1	17.8	± 0.7*	(6)	
	C750S	-79.5	± 1.8	14.8	± 0.1*	(5)	
Kombinations-mutanten	C828S	-87.1	± 0.4*	15.8	± 0.4	(6)	
	3Cys	-99.0	± 1.7 ¹ *	21.6	± 0.8 ¹ *	(5)	
	10Cys	-88.5	± 4.3 ¹	25.2	± 2.8 ¹ *	(3-4)	
	ΔN	-81.2	± 2.6 ¹	21.6	± 1.2 ¹	(11)	
	ΔN/3Cys	-90.2	± 3.4 ¹	21.8	± 1.1 ¹	(8)	
	ΔN/C723S	-98.9	± 2.8 ¹ *	23.3	± 1.5 ¹	(6)	
	Δ(2-15)/C723S	-77.8	± 2.6	22.2	± 2.8	(4-5)	

Tabelle A-13: Analyse der Aktivierung der Met/Cys-Kombinationsmutanten
(*P<0.05/WT); (*P<0.05/(Δ2N/C723S))

Aktivierung					
Kanal	V_h (mV)		k_h (mV)	(N)	τ_{akt} (ms)
WT	-3.2	± 1.2	9.7	± 0.2 (30)	201.9 ± 13.5 (25)
C723S/M554L	-39.9	± 0.8*	6.7	± 0.7* (7)	39.8 ± 2.3* (6)
C723S/M651L	-38.3	± 1.0*	7.1	± 0.5* (8)	46.6 ± 2.1* (8)
C723S/M713L	-32.5	± 1.3*	8.9	± 2.1 (6)	63.9 ± 8.1* (6)
ΔN/C723S	-16.8	± 2.9	11.7	± 0.8 (7)	128.2 ± 19.4 (7)
ΔN/C723S/M554L	-38.2	± 2.1*	6.7	± 0.7* (10)	51.2 ± 10.4* (8)
ΔN/C723S/M651L	-32.3	± 3.8*	9.4	± 1.1 (6)	72.6 ± 1.4* (6)
ΔN/C723S/M713L	-24.7	± 1.1*	9.2	± 0.3* (8)	80.7 ± 2.8* (8)

Tabelle A-14: Analyse der Deaktivierung der Met/Cys-Kombinationsmutanten
(*P<0.05/WT); (*P<0.05/(Δ2N/C723S))

Deaktivierung (τ_{deakt})				
Kanal	-145 mV	-120 mV	-95 mV	(N)
WT	21.5 ± 0.8	36.7 ± 1.1	74.6 ± 3.2	(26-29)
C723S/M554L	14.6 ± 0.9 ¹ *	26.0 ± 2.9 ¹ *	61.6 ± 1.1 ¹ *	(7)
C723S/M651L	17.5 ± 0.5*	32.6 ± 1.3	68.2 ± 3.8	(6)
C723S/M713L	18.9 ± 3.2	32.6 ± 4.7	69.0 ± 1.0	(5)
ΔN/C723S	14.9 ± 0.9 ¹	18.4 ± 0.9 ¹	28.4 ± 1.4 ¹	(6)
ΔN/C723S/M554L	10.0 ± 0.6 ¹ *	18.7 ± 1.0 ¹	50.1 ± 3.5 ¹ *	(6)
ΔN/C723S/M651L	14.3 ± 0.6 ¹	22.6 ± 0.7 ¹ *	39.8 ± 2.6 ¹ *	(6)
ΔN/C723S/M713L	9.8 ± 0.3 ¹ *	15.0 ± 0.5 ¹ *	25.5 ± 1.2 ¹	(6)

Tabelle A-15: Analyse der Inaktivierung der Met/Cys-Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/(Δ2N/C723S))

Inaktivierung (τ_{inakt})				
Kanal	55 mV	30 mV	5 mV	(N)
WT	10.1 ± 0.3	13.9 ± 0.3	16.6 ± 0.3	(24)
C723S/M554L	9.8 ± 0.1 ¹	14.0 ± 0.5 ¹	16.7 ± 0.9 ¹	(5-7)
C723S/M651L	13.1 ± 0.5*	19.2 ± 0.6*	25.3 ± 0.7*	(5)
C723S/M713L	10.0 ± 1.0	14.6 ± 1.1	19.9 ± 2.5	(4-5)
ΔN/C723S	12.9 ± 0.7¹	18.1 ± 0.7¹	20.7 ± 0.7¹	(6)
ΔN/C723S/M554L	10.9 ± 0.4 ^{1*}	15.4 ± 0.4 ^{1*}	17.7 ± 2.9	(5-6)
ΔN/C723S/M651L	16.2 ± 0.5 ^{1*}	22.2 ± 0.3 ^{1*}	28.0 ± 0.3 ^{1*}	(6)
ΔN/C723S/M713L	11.9 ± 0.3 ¹	17.1 ± 0.3 ¹	20.0 ± 1.4	(5-6)

Tabelle A-16: Rückkehr aus der Inaktivierung der Met- und Cys-Kombinationsmutanten (*P<0.05/WT); (*P<0.05/(Δ2N/C723S))

Rückkehr aus der Inaktivierung			
Kanal	V_{h_inakt} (mV)	k_{h_inakt} (mV)	(N)
WT	-84.2 ± 1.0	15.7 ± 0.5	(28)
C723S/M554L	-73.2 ± 2.9 ^{1*}	22.0 ± 1.2 ^{1*}	(5)
C723S/M651L	-88.3 ± 2.3	17.7 ± 1.5	(5)
C723S/M713L	-77.1 ± 2.2*	18.1 ± 1.5	(5)
ΔN/C723S	98.9 ± 2.8¹	23.3 ± 1.5¹	(6)
ΔN/C723S/M554L	-77.4 ± 2.7 ^{1*}	26.6 ± 1.2 ¹	(5)
ΔN/C723S/M651L	-107.4 ± 2.8 ¹	22.2 ± 2.3 ¹	(6)
ΔN/C723S/M713L	-89.1 ± 1.4 ^{1*}	21.7 ± 1.1 ¹	(5)

Tabelle A-17: Analyse der Aktivierung und Deaktivierung von Δ(2-15)-hERG in Oozyten (*P<0.05/Δ2N)

Aktivierung mit V_{h_akt} (mV)		Deaktivierung, τ_{deakt} bei -100 mV (ms)	(N)
ΔN	-30.5 ± 3.5	13.4 ± 2.7	(10)
Δ(2-15)	-12.1 ± 3.4	19.0 ± 2.5	(7)

Diese Messungen wurden im Modus der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von Dr. Roland Schönherr durchgeführt (externe Lösung: 10 mM Kalium). Die Bestimmung von τ_{deakt} wurde hier mit einer einfachen exponentiellen Anpassung vorgenommen.

Ehrenwörtliche Erklärung von Katrin Kolbe:

Mir ist die geltende Promotionsordnung der biologisch-pharmazeutischen Fakultät der Universität Jena bekannt.

Ich habe meine Dissertation selbst angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen sind in dieser Arbeit angegeben.

Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Niemand hat unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe diese Dissertation noch nie vorher als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Auch wurde keine gleiche oder in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. S.H. Heinemann für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Guido Gessner für die Einführung in die Arbeitsmethoden der Elektrophysiologie sowie für die intensive Unterstützung bei der Auswertung dieser Daten und Priv. Doz. Dr. Schönherr für seine wertvollen Hilfestellungen in allen Fragen der Molekularbiologie.

Bei Angela, Gudrun und Steffi möchte ich mich für Ihre unschätzbare Hilfsbereitschaft und für all die Tätigkeiten zur Aufrechterhaltung des Laborbetriebes bedanken.

Hier möchte ich allen weiteren ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ein herzliches Dankeschön aussprechen für die vielen Tipps und das angenehme Arbeitsklima. Besonders erwähnen möchte ich Alfred, Kristina, Enrico, Mario und Nirakar, deren hilfreiche Ratschläge, Kritik und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Es war mir eine Freude, mit Euch zusammenzuarbeiten.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle bei Nicole, Robert, Marco, Tanja, Stefan, Rayk und Gerlinde bedanken. Ein ausdrückliches Danke für seine wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung dieses Manuskripts möchte ich an dieser Stelle auch noch einmal an Herrn Prof. Dr. S.H. Heinemann richten.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mein naturwissenschaftliches Interesse immer gefördert haben, mir stets den Rücken gestärkt haben und mir die Kraft gaben durchzuhalten. Auch geht ein Dank an Christian für seine Geduld und Hilfe.

Vor allem in der Schlussphase haben Anne, Andrea und Robert auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke Euch.